

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



<b>THOMSON</b>  <b>DELPHION</b>		<b>RESEARCH</b>	<b>PRODUCTS</b>	<b>INSIDE DELPHION</b>
<a href="#">Log Out</a>	<a href="#">Work Files</a>	<a href="#">Saved Searches</a>	<a href="#">My Account</a>   <a href="#">Products</a>	Search: <a href="#">Quick/Number</a> <a href="#">Boolean</a> <a href="#">Advanced</a> <a href="#">Derwent</a>

## The Delphion Integrated View

Get Now:  [PDF](#) | [More choices...](#)

Tools: Add to Work File: [Create new Work](#)

View: [Expand Details](#) | [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#)  Go to: [Derwent](#)

 [E](#)

**Title:** WO9738096A1: NOVEL PHYTASE AND GENE ENCODING SAID PHYTASE[[French](#)]

**Derwent Title:** Recombinant Aspergillus-derived phytase - useful as animal feedstuff additive [[Derwent Record](#)]

**Country:** WO World Intellectual Property Organization (WIPO)

**Kind:** A1 Publ.of the Int.Appl. with Int.search report <sup>1</sup>

**Inventor:** KONDO, Hidemasa; 3-6-6, Asahi-cho, Machida-shi, Tokyo 194, Japan  
 ANAZAWA, Hideharu; 4-19-18, Minamioizumi, Nerima-ku, Tokyo 178, Japan  
 KANEKO, Syunichi; 20-6, Aza-Miyamae, Wakamatsu-cho, Okazaki-shi, Aichi 444, Japan  
 NAGASHIMA, Tadashi; 13-5-406, Chayabo, Sakurai-cho, Anjo-shi, Aichi 444-11, Japan  
 TANGE, Tatsuya; 2-2, Shinkawa, Nishi-machi, Chiryu-shi, Aichi 472, Japan

**Assignee:** SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD., 19-10, Showa-cho, Anjo-shi, Aichi 446, Japan  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

**Published / Filed:** 1997-10-16 / 1997-04-04

**Application Number:** WO1997JP0001175

**IPC Code:** [C12N 9/16](#); [C12N 15/55](#); [C12N 1/15](#); [C12N 1/19](#); [C12N 1/21](#); [A23K 1/165](#);

**ECLA Code:** [A23K1/165B](#); [C12N9/16](#);

**Priority Number:** 1996-04-05 JP1996000084314

**Abstract:** A phytase that has a low Km value with respect to phytic acid and is inexpensive; a DNA encoding the phytase; a recombinant DNA comprising the above DNA integrated thereinto; a transformant having the recombinant DNA; a process for producing the phytase by using the transformant; and a feed prepared by using the phytase. [[French](#)] [[Japanese](#)]

**Attorney, Agent or Firm:** HIRAKI, Yusuke ;

**INPADOC Legal Status:** [Show legal status actions](#)

Get Now: [Family Legal Status Report](#)

**Designated Country:** AU BG BR CA CN CZ HU JP KR MX NO NZ PL RO SG SI SK UA US VN,  
 European patent: AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE,  
 Eurasian patent: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM

**Family:** [Show 13 known family members](#)

**Other Abstract Info:** CHEMABS 127(26)356533Q CHEMABS 127(26)356533Q DERABS C1997-512713 DERABS C1997-512713



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



[Nominate](#)



[this for the Gallery...](#)

© 1997-2004 Thomson

[Research Subscriptions](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [↑](#)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 9/16, 15/55, 1/15, 1/19, 1/21, A23K 1/165</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/38096</p> <p>(43) 国際公開日 1997年10月16日(16.10.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01175</p> <p>(22) 国際出願日 1997年4月4日(04.04.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/84314 1996年4月5日(05.04.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/J) 〒100 東京都千代田区大手町1-6-1 Tokyo, (JP) 新日本化学工業株式会社 (SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.)(JP/J) 〒446 愛知県安城市昭和町19-10 Aichi, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 近藤英正(KONDO, Hidemasa)(JP/J) 〒194 東京都町田市旭町3-6 Tokyo, (JP) 穴澤秀治(ANAZAWA, Hideharu)(JP/J) 〒178 東京都練馬区南大泉4-19-18 Tokyo, (JP) 兼子俊一(KANEKO, Syunichi)(JP/J) 〒444 愛知県岡崎市若松町字宮前20-6 Aichi, (JP)</p>		<p>長島 直(NAGASHIMA, Tadashi)(JP/J) 〒444-11 愛知県安城市桜井町茶屋坊13-5-406 Aichi, (JP) 丹下達也(TANGE, Tatsuya)(JP/J) 〒472 愛知県知立市西町新川2-2 Aichi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL PHYTASE AND GENE ENCODING SAID PHYTASE</p> <p>(54)発明の名称 新規フィターゼおよび該フィターゼをコードする遺伝子</p> <p>(57) Abstract A phytase that has a low Km value with respect to phytic acid and is inexpensive; a DNA encoding the phytase; a recombinant DNA comprising the above DNA integrated thereinto; a transformant having the recombinant DNA; a process for producing the phytase by using the transformant; and a feed prepared by using the phytase.</p>		

(57) 要約

本発明は、フィチン酸に対するK<sub>m</sub>値が小さく安価なフィターゼ、該フィターゼをコードするDNA、該DNAを組み込んだ組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を用いたフィターゼの製造法及び該フィターゼを用いた飼料に関する。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	JP	日本	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	KE	ケニア	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SD	スーダン		
DK	デンマーク			SE	スウェーデン		
EE	エストニア						



## 明 細 書

### 新規フィターゼおよび該フィターゼをコードする遺伝子

#### 技術分野

本発明は、飼料中に含まれる抗栄養因子としてのフィチン酸を分解し、飼料の栄養価値を向上させると共に、該分解により遊離したリン酸の効率よい利用を可能とさせる、フィチン酸に対するミカエリス定数（以下、 $K_m$ と略す）の値が小さく安価なフィターゼ、および該フィターゼをコードする遺伝子に関する。

#### 背景技術

リンは、全ての生物に必須の元素である。家畜生産に使用されている、植物由来の飼料には、リンが含まれているが、そのうち50～70%がフィチン酸として存在している。フィチン酸は、植物種子に多量に存在しリン酸の主要な貯蔵物質である。しかし、フィチン酸は、豚、ニワトリ等の単胃動物の消化器で分解、吸収されずに排出されてしまう。即ち、フィチン酸はリン酸の貯蔵物質であるにもかかわらず、そのリンは全く利用されていない。従って、単胃動物の飼料には、生育促進の目的で、リン酸が添加されている。

飼料へのリン酸の添加は、排泄物中のリンの量をも増加させることになる。近年、家畜生産が著しく増加するに伴い、家畜の排泄物も増大し、世界中で環境問題を起こしている。特に、排泄物中に含まれるリンは、湖沼の富栄養化現象を引き起こす原因に上げられ、排泄物中のリンの量が規制されるようになり、対処の必要が生じている。

さらに、排泄されるリンの問題とともに、フィチン酸は、栄養源として重要なマグネシウム、カルシウム、亜鉛、鉄等の2価の金属類をキレート化し動物に吸収されにくくしてしまい、飼料を栄養価値の低い物としてしまう。そのため、フ

イチン酸は、抗栄養因子と考えられている。

以上のことから、フィチン酸塩をイノシトールと無機リン酸に加水分解する酵素として広く知られているフィターゼを用いて飼料を処理し、フィチン酸よりリン酸を遊離させ、該遊離リン酸を、これまで添加していたリン酸の代わりに利用し、排泄物中のリンの量を減少させること、および、抗栄養因子としてのフィチン酸を分解することによる飼料の栄養価値の向上が検討されている〔米国特許第3,297,548号(1967)、J. Nutrition, 101, 1289-1294 (1971)〕。

フィターゼを生産する微生物としては、枯草菌 (Bacillus subtilis) およびシュードモナス (Pseudomonas) 等のバクテリア、サッカロマイセス・セレビジエ (Saccharomyces cerevisiae) 等の酵母菌、およびアスペルギルス・テリウス (Aspergillus terreus)、アスペルギルス・フィカム (Aspergillus ficcum)、アスペルギルス・アワモリ (Aspergillus awamori) 等の糸状菌等が知られている。

アスペルギルス・フィカム由来のフィターゼに関して、精製操作および生化学的性質については Preparative Biochem., 18, 443-458 (1988) に、フィターゼ遺伝子およびアミノ酸配列については Gene, 127, 87-94 (1993) に記載されている。

アスペルギルス・アワモリ由来のフィターゼに関しては、塩基配列およびアミノ酸配列が Gene, 133, 55-62 (1993) に記載されている。

また、これまでに知られているフィターゼのミカエリス定数 ( $K_m$ ) の値は、Wheat Bran の  $0.57 \text{ mM}$  [Agr. Biol. Chem., 26, 794-803 (1962)]、Rice Bran の  $0.17 \text{ mM}$  [Agr. Biol. Chem., 53, 1475-1483 (1988)]、maize (Zea mays) の  $117 \mu\text{M}$ 、Aspergillus ficcum の  $250 \mu\text{M}$  (WO 91/05053)、Aspergillus oryzae の  $330 \mu\text{M}$ 、Bacillus subtilis の  $150 \mu\text{M}$ 、Bacillus natto の  $500 \mu\text{M}$ 、Escherichia coli の  $130 \mu\text{M}$  である。

酵素が持つ能力を充分に発揮するためには、基質濃度が  $K_m$  値より高い必要が

あり、最大反応速度 ( $V_{\max}$ ) が同じであれば、 $K_m$  値の小さい酵素は、 $K_m$  値の大きい酵素と比較して、基質濃度が低くなっても反応速度は減少しない。

即ち、 $K_m$  値の小さい酵素は、低い基質濃度でも、十分な分解速度を保つことができ、 $K_m$  値の大きな酵素と比較して分解されない基質残量を少なくできる利点を持つ。

飼料中に含まれる抗栄養因子としてのフィチン酸を分解し、飼料の栄養価値を向上させると共に、該分解により遊離したリン酸の効率よい利用を可能とさせる、フィチン酸に対する  $K_m$  値が小さく安価なフィターゼが求められている。

### 発明の開示

本願発明は、フィチン酸を基質としたとき  $10 \sim 30 \mu M$  のミカエリス定数を有するフィターゼ（以下、新規フィターゼという）、該フィターゼをコードする DNA、該 DNA を組み込んだ組換え体 DNA、該組換え体 DNA を保有する形質転換体、該形質転換体を用いたフィターゼの製造法および該フィターゼを含有する動物用飼料に関する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の新規フィターゼに含まれる具体例としては、下記の物理化学的性質を有するフィターゼ

- ①  $K_m$  値；  $10 \sim 30 \mu M$  である。
- ② 分子量（SDS-PAGE 法）；エンドグリコシダーゼ H 処理後の分子量は約  $60 kDa$  である。
- ③ 至適 pH；pH  $5.0 \sim 6.5$  である。
- ④ 至適温度； $45 \sim 65^\circ C$  で最大活性を示す。
- ⑤ 基質特異性；フィチン酸、p-ニトロフェニルリン酸、D-グルコース 6-リン酸、フラクトース 6-リン酸、D-ミオイノシトール 1,4,5-三リン酸、グリセロールリン酸およびアデノシン三リン酸を基質として作用する。

⑥等電点電気泳動；pI 4.7～5.4である。

あるいは、配列番号1または2に示したアミノ酸配列を有する蛋白質等が挙げられる。

また、上記記載の新規フィターゼに分泌シグナルペプチドの結合したアミノ酸配列を有する新規フィターゼも本発明に含まれ、例えば、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有する新規フィターゼをあげることができる。

さらに、配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列で、配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列と40%以上の相同性を有し、かつフィチン酸を基質としたとき10～30  $\mu$ MのKm値を有するフィターゼをあげることができる。該フィターゼの好ましい例としては、60%以上の相同性のアミノ酸配列を有するものをあげることができ、更に好ましい例としては、80%以上の相同性のアミノ酸配列を有するものをあげることができる。

ここで、アミノ酸の置換、欠失または付加は、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), 8章 Mutagenesis of Cloned DNA, John Wiley & Sons, Inc. (1989)等に記載の方法に準じて実施することができる。

また、該新規フィターゼは、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物より取得することができる。このような微生物としては、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物であればいずれでもよいが、好ましくは、アスペルギルス属に属し、かつ、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物をあげることができる。さらに好ましくは、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) S

K 5 7 株 (FERM BP-5 4 7 3) あるいは、これらの菌株の突然変異株もしくは誘導体をあげることができる。アスペルギルス・ニガー SK 5 7 株から誘導された変異株としてアスペルギルス・ニガー SK 9 2 株 (FERM BP-5 4 8 1) をあげることができる。

本発明にかかわる新規フィターゼをコードする遺伝子（以下、新規フィターゼ遺伝子と呼ぶ）としては、新規フィターゼをコードする遺伝子であればいずれでもよく、例えば、配列番号 1、2 または 3 で表されるアミノ酸配列を有するフィターゼをコードする遺伝子、あるいは、配列番号 1、2 または 3 で表されるアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有し、かつフィチン酸を基質としたとき  $10 \sim 30 \mu\text{M}$  の  $K_m$  値を有するフィターゼをコードする遺伝子をあげることができる。遺伝子の DNA 配列中にイントロンを含んでいてもよい。具体的には、配列番号 4 や DNA 配列中にイントロンを含む配列番号 5 で示される DNA 等をあげることができる。

さらに、本発明にかかわる新規フィターゼ遺伝子として、新規フィターゼ活性を有し、且つ、上記で定義される DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA をあげることができる。

該ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な DNA とは、配列番号 4 または 5 に示した塩基配列を含む DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、 $0.7 \sim 1.0 \text{ M}$  の  $\text{NaCl}$  存在下、 $65^\circ\text{C}$  でハイブリダイゼーションを行った後、 $0.1$  倍～ $2$  倍濃度の  $\text{SSC}$  溶液（ $1$  倍濃度の  $\text{SSC}$  溶液の組成は、 $150 \text{ mM}$  塩化ナトリウム、 $15 \text{ mM}$  クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、 $65^\circ\text{C}$  条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版〔サンプブルック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊、以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略す〕等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号4または5に示した塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、更に好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

該新規フィターゼ遺伝子を含むDNA断片は、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物より取得することができる。このような微生物としては、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物であればいずれでもよいが、好ましくは、アスペルギルス属に属し、かつ、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物をあげられ、さらに好ましくは、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*) SK57株あるいは、これらの菌株の突然変異株もしくは誘導株をあげることができる。アスペルギルス・ニガーSK57株の突然変異株としてアスペルギルス・ニガーSK92株をあげることができる。

アスペルギルス・ニガーSK57株は平成8年3月22日付けで、アスペルギルス・ニガーSK92株は平成8年3月12日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305)にそれぞれFERM BP-5473およびFERM BP-5481として寄託されている。

さらに、本発明の動物用飼料として、新規フィターゼを含む動物用飼料をあげることができる。

以下に、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物由来のフィターゼ遺伝子の取得方法を記す。

新規フィターゼを生成する能力を有する微生物から、通常のDNA単離法、例

えばフェノール法 [Biochim. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)] により、該微生物の染色体DNAを調製する。得られた染色体DNAを適当な制限酵素により切断し該制限酵素切断断片をベクターDNAに組込むことにより、該微生物染色体のDNAライブラリーを構築する。このDNAライブラリーを用いて宿主微生物を形質転換する。得られた形質転換体からハイブリダイゼーション法により、新規フィターゼ遺伝子を含む形質転換体の選択を行う。選択された形質転換体より目的とする遺伝子を含むDNAを得ることができる。

この一連の操作は、公知の*in vitro*組換え技法 (モレキュラー・クローニング 第2版) に準じて行うことができる。

新規フィターゼを生成する能力を有する微生物の染色体DNAライブラリーを構築するベクターDNAとしては、大腸菌K12株において自律複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミッドベクターなどいずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBlue-script II SK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λzap II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA クローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、Lambda Blue Mid (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7 T3 18U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] およびpUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

宿主微生物としては、エッシェリヒア属に属する微生物であればいずれでも使用することができる。具体的には、Escherichia coli XLI-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Bio

1., 16, 118 (1966)] および Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)], Escherichia coli JM109, Escherichia coli XL1-Blue, Escherichia coli XL2-Blue, Escherichia coli DH1, Escherichia coli MC1000等があげられる。

新規フィターゼ遺伝子を含む形質転換体はハイブリダイゼーション法により選択できる。

ハイブリダイゼーション法に使用するプローブとしては、新規フィターゼのアミノ酸配列を部分的に決定し、該アミノ酸配列の情報を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブとしてあげることができる。また、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物に近縁の種に属する微生物の、フィターゼ遺伝子が取得されている場合には、該遺伝子をプローブとして利用できる場合もある。このようなプローブとして利用できる遺伝子として、アスペルギルス・フィカム (Aspergillus ficcum) のフィターゼ遺伝子をあげることができる。

アスペルギルス・フィカムのフィターゼ遺伝子は、前述の染色体DNAの調製法に準じて調製後、アスペルギルス・フィカムのフィターゼ遺伝子のDNA配列の情報を基にDNAプライマーを合成し、ポリメラーゼチェーンリアクション (Polymerase Chain Reaction: PCR) 法により増幅し取得することができる。

DNAプライマーの合成は、通常用いられるDNA合成機、例えば、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392、アブライド・バイオシステムズ社製380A・DNA合成機等を用いて行うことができる。このようにして合成されたDNAプライマーとして、例えば、配列番号6または7に示されたDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーション法により選択された形質転換体より得られた新規フィターゼ遺伝子を含むDNAを、通常用いられる塩基配列分析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)] 等によって分析することによって、該遺伝子の塩基配列を決定することがで



きる。塩基配列の分析を、塩基配列自動分析装置、例えばSQ-5500 DNAシーケンサー（日立製作所社製）あるいは373A・DNAシーケンサー（パーキンエルマー社製）を用いて行うこともできる。

このようにして決定された新規フィターゼ遺伝子の塩基配列として、例えば配列番号4または5に示された塩基配列をあげることができる。

上記のようにして得られる新規フィターゼ遺伝子を宿主中で発現させるために、モレキュラー・クローニング 第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1〜34等に記載された方法等を用いることができる。

まず、新規フィターゼ遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素類あるいはDNA分解酵素類で、新規フィターゼ遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主中に導入する。

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エッシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する原核生物、アスペルギルス属、リゾプス属、トリコデルマ属、ノイロスボラ属、ムコール属、ペニシリウム属等に属する糸状菌株、クルイベロミセス属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、トリコスボロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株、動物細胞、昆虫細胞等をあげることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、新規フィターゼ遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主として用いる場合は、新規フィターゼ発現ベクターは微生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規フィターゼ遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プ

ロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pKK233-2 (ファルマシア社)、pSE280 (インビトロジェン社)、pGEMEX-1 [プロメガ(Promega)社]、pQE-8 (キアゲン(QIAGEN)社)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript (STRATAGENE社)、pTrs30 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [pGHA2を含む大腸菌はEscherichia coli IGHA2 (FERM BP-400)として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている、特開昭60-221091]、pGKA2 [pGKA2を含む大腸菌はEscherichia coli IGKA2 (FERM B-6798)として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている、特開昭60-221091]、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pGEX (Pharmacia社)、pETシステム (Novagen社)、pSupex等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp x 2)、tacプロモーター、T7プロモーター、P<sub>letI</sub>プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミッドを用いることが好ましい。

新規フィターゼ遺伝子は新規フィターゼをコードする遺伝子であればいずれも

用いることができるが、該遺伝子のDNA配列を宿主微生物での発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換して用いることが好ましい。

本遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属等に属する微生物、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) XL1-Blue、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) XL2-Blue、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) DH1、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) MC1000、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) KY3276、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) W1485、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) JM109、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) HB101、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) No. 49、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) W3110、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) NY49、バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、ブレビバクテリウム・イマリオフィラム (Brevibacterium immariophilum) ATCC14068、ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (Brevibacterium saccharolyticum) ATCC14066、ブレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) ATCC14067、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメントム (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミクム (Corynebacterium glutamicum) ATCC13032、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (Corynebacterium acetoacidophilum) ATCC13870、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム (Microbacterium ammoniaphilum) ATCC15354 等を挙げることができる。

糸状菌株を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p3SR2 [Gene, 26, 205-221 (1983)]、pKBY2 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 834-838 (1985)]、pSal23 [Agric. Biol. Chem., 51, 2549-2555 (1987)]、pSTA1

4 [Mol. Gen. Genet., 218, 99-104 (1989)]、pDJB2 [Gene, 36, 321-331 (1989)]、pLeu4 [Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1503-1504 (1992)]等の発現ベクターを例示することができる。

プロモーターとしては、糸状菌株の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、アスペルギルス属のグルコアミラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼあるいはトリコデルマ属のセルラーゼ（セロビオヒドラーゼ）などデンプンやセルロースで強く誘導されるプロモーター、解糖系酵素のホスホグリセレートキナーゼ (pgk)、グリセルアルデヒド 3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (gpd) のプロモーター等のプロモーターをあげることができる。

新規フィターゼ遺伝子としては、新規フィターゼをコードする遺伝子であればいずれも用いることができるが、好ましくは、新規フィターゼを菌体外へ分泌させるために、新規フィターゼのN末端アミノ酸に分泌シグナル配列を有するペプチドの結合したアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子をあげることができる。分泌シグナル配列を有するペプチドとしては、アスペルギルス属のグルコアミラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼにおける分泌シグナル配列、配列番号 2 に示されたアミノ酸配列の 1 から 24 番目までの配列を有するペプチド等をあげることができる。

宿主としては、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) SK 57、(アスペルギルス・オリゼ) Aspergillus oryzae M-2-3 [Agric. Biol. Chem., 51, 2549-2555 (1987)]、アスペルギルス・フィカム (Aspergillus ficcum) NRRL3135、アスペルギルス・アワモリ (Aspergillus awamori) NRRL3112、アスペルギルス・ニデュランス (Aspergillus nidulans) IFO4340、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) Rut-C-30 [Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 46-53 (1984)]、リゾッパス・ニベアス (Rhizopus niveus) M-37 [Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1503-1504 (1992)]等を挙げることができる。

糸状菌株の形質転換は五味らの方法 [Agric. Biol. Chem., 51, 2549 (198

7)) 等に準じて行うことができる。

酵母菌株を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Y E p 1 3 (ATCC37115)、Y E p 2 4 (ATCC37051)、Y C p 5 0 (ATCC37419) 等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主としては、サッカロミセス・セレビシェ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスボロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シワニオミセス・アルビアス (*Schwanniomyces alluvius*) 等を挙げることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p A G E 1 0 7 [特開平3-22979 ; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p A S 3 - 3 (特開平2-227075)、p C D M 8 [Nature, 329, 840 (1987)]、p c D N A I / A m p (インビトロジェン社製)、p R E P 4 (インビトロジェン社製) p A G E 1 0 3 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p A G E 2 1 0 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のI E (immediate

early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT 5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

動物細胞へのDNAの導入法としては、動物細胞にDNAを導入することができる方法も用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)] 等を用いることができる。

形質転換株の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1-34、Bio/Technology, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac111 (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Aut

ographa californica nuclear polyhedrosis virus) などを用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞である S f 9、S f 2 1 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W.H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞である H i g h 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等をおこなうことができる。

糸状菌、酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

新規フィターゼを製造するために、上記形質転換体に加え、新規フィターゼを生成する能力を有する微生物および新規フィターゼを生成する能力を有する微生物からさらに新規フィターゼの生産性の向上した変異株を用いることができる。

新規フィターゼの生産性の向上した変異株は、通常の変異処理をすることにより取得することができる。

新規フィターゼを生成する能力を有する微生物、該微生物から誘導された変異株または新規フィターゼ遺伝子を組み込んだ組換え体 D N A を保有する形質転換体を通常の培養方法に従って培養し、新規フィターゼを生成蓄積させ、該培養物より新規フィターゼを採取することにより、新規フィターゼを製造することができる。以下、新規フィターゼを製造するために用いる上記微生物、変異株、形質

転換体を、新規フィターゼ製造用生物と呼ぶ。

新規フィターゼ製造用生物が大腸菌等の原核生物、糸状菌や酵母菌等の真核生物である場合、該生物を培養する培地は、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、りん酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、りん酸第一カリウム、りん酸第二カリウム、りん酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

また、糸状菌の培養においては、小麦フスマ、米糠等を、炭素源、窒素源および無機物源等とし、適当な塩類を補強したものを培地として用いることもできる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持するが、糸状菌の培養においてはpH3.0～6.5に保持することが好ましい。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。



プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロビル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

糸状菌を小麦フスマ等の固形成分を含む培地で培養する場合には、糸状菌を植菌後、固形成分と糸状菌とを充分混合し均一にし、アルミまたはステンレス製の多数のトレイに薄くひろげてムロ内に置き、温度、湿度、通気を制御しながら培養する。具体的には、湿度100%の培養室で、25～35℃、3～10日間静置培養する。

新規フィターゼ製造用生物が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で行う。培養温度は35～37℃がよく、培養時間は、通常3～7日間である。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell 400、ExCell 405〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕等を用いることができる。

培養温度は25～30℃がよく、培養時間は、通常1～4日間である。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

新規フィターゼ製造用生物の培養液から、新規フィターゼを単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いることができる。

例えば、新規フィターゼが新規フィターゼ製造用生物の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を水系緩衝液等で洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）セファロース、DIAION HPA-75

（三菱化成社製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（ファルマシア社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製酵素標品を得ることができる。

また、該新規フィターゼが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該新規フィターゼを回収後、該新規フィターゼの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該新規フィターゼを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

細胞外へ該新規フィターゼを分泌する場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。培地成分に固形成分、例えば小麦フスマ等、がある場合には、温水等で新規フィターゼを抽出した後、遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上

清からの単離精製法と同様の手法により、新規フィターゼの精製酵素標品を得ることができる。

新規フィターゼの活性は、下記標準活性測定法に従って測定する。

2. 5 mM フィチン酸ナトリウム（シグマ社製）を含む 0.2 M 酢酸緩衝液 pH 5.5（酢酸ナトリウム）0.5 ml を 37℃ で 5 分間保温した後、酵素液 0.5 ml を加えて反応を開始する。37℃ で 10 分間保温した後、酵素反応停止液（10 mM モリブデン酸アンモニウム、5 N 硫酸、アセトンを 1 : 1 : 2 の比率で混合した溶液）を 2 ml 添加して反応を停止し、さらに 1 M クエン酸 0.1 ml を加え混合する。この溶液の 380 nm における吸光度を分光光度計（日立 U-2000）により測定する。フィターゼ活性 1 ユニット（unit）を pH 5.5、37℃ で、1 分間に 1  $\mu$ mol の無機リンを遊離する酵素量と定義する。

新規フィターゼの  $K_m$  値は、基質濃度を変化させたときの新規フィターゼの活性を上記標準活性測定法に従って測定後、得られた結果をラインウィーバー・バーク（Lineweaver-Burk）プロットすることにより、求めることができる。

本発明の新規フィターゼは、フィチン酸塩をイノシトールと無機リン酸に変換するために必要とされる、様々な工程に利用することができる。

例えば、動物飼料、大豆加工、ブタおよび家禽の液体飼料、フィチン酸塩からイノシトールまたはイノシトールリン酸塩の製造等に利用することができる。

動物飼料としては、例えば以下のようなものをあげることができる。

本発明の新規フィターゼを小麦もみがらなどのキャリアー物質と混ぜて混合し、噴霧塔または流動床中で乾燥させる。該乾燥物に、ソルビトール等の浸透圧を安定化できる物および安息香酸等の防腐剤を添加した物等を動物飼料としてあげることができる。動物飼料における新規フィターゼの使用量は、動物飼料 1 kg に対して新規フィターゼ 10 ~ 5000 U、好ましくは 100 ~ 1000 U である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、アスペルギルス・ニガーSK52株由来のフィターゼ遺伝子の制限酵素地図を示す図である。図中、矢印はフィターゼをコードしている領域を示している。

第2図は、プラスミドpANPHY1の制限酵素地図を示す図である。

Phytaseは新規フィターゼ遺伝子を、Amp<sup>r</sup>はpUC118由来のアンピシリン耐性遺伝子を示す。矢印は遺伝子の転写並びに翻訳の方向を示す。

第3図は、新規フィターゼの分子量を測定した時の、SDS-PAGEによる電気泳動の図である。

第4図は、新規フィターゼの分子量を測定した時の、検量線の図である。

第5図は、新規フィターゼの至適pHを表す図である。最大の活性を示したpH条件の時の活性値を100%として、各pHにおける活性を相対活性(%)で示した。

第6図は、新規フィターゼのpH安定性を表す図である。

第7図は、新規フィターゼの至適温度を表す図である。最大の活性を示した温度条件の時の活性値を100%として、各温度における活性を相対活性(%)で示した。

第8図は、新規フィターゼの温度安定性を表す図である。4℃の時の活性値を100%として、各温度における活性を相対活性(%)で示した。

第9図は、新規フィターゼの等電点を表す電気泳動の図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 〔実施例1〕 新規フィターゼをコードする染色体由来のDNAの取得

###### ① アスペルギルス・ニガーSK57株の菌体の調製

500mlバッフル付き三角フラスコに麦芽エキス培地(2%麦芽エキス、2%グルコース、0.1%ペプトン)100mlを添加し、シリコン栓をした後、120℃、20分間滅菌した。

該培地にSK57株を植菌して、28℃、7日間、振とう培養を行った。

該培養液を滅菌処理したガラスフィルターでろ過することにより、0.5gのSK57株の菌体を取得した。

## ② 菌体から全DNAの単離、精製

実施例1-①で取得したSK57株の菌体をペーパータオルではさみ圧縮して脱水した。該菌体を-80℃に冷却した乳鉢に入れ、液体窒素を注ぎ凍結した後、-80℃で冷却した乳棒で細かく破碎した。

細かく破碎した該菌体を遠心管に取り、TE緩衝液〔10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA〕を0.2ml加え懸濁した。該懸濁液に溶菌溶液〔2% SDS、0.1M NaCl、10mM EDTA、50mM Tris-HCl (pH7.0)〕を0.2ml加え、溶菌した。該溶菌液を4℃、15,000rpm (18,500xg)で10分間遠心分離し、得られた上清を新しい遠心管に回収した。

該上清に0.4mlのフェノール処理溶液（フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールを25:24:1の比率で混合した溶液）を加え、緩やかに攪拌した後、4℃、15,000rpm (18,500xg)で10分間遠心分離し、得られた上清を新しい遠心管に回収した。この操作を3回繰り返し、上清を新しい遠心管に回収した。

該上清に1mlの冷エタノールを加え、-80℃で10分間冷やした後、4℃、15,000rpm (18,500xg)で10分間遠心分離し、沈殿（DNA）を回収した。

該沈殿を真空乾燥した後、0.5mlのTE緩衝液を加え、沈殿物を溶解した。

該溶液に5μlのRNaseA (10mg/ml)を加え、37℃で30分間保温した。

該処理溶液に0.5mlのフェノール処理溶液を加え、緩やかに攪拌し、4℃、15,000rpm (18,500xg)で10分間遠心分離し、得られた上清を

新しい遠心管に回収した。この操作を2回繰り返し、上清を新しい遠心管に回収した。

該上清に0.5 mlのクロロホルム処理溶液(クロロホルム、イソアミルアルコールを24:1の比率で混合した溶液)を加え、4℃、15,000 rpm (18,500 x g)で10分間遠心分離し、得られた上清を新しい遠心管に回収した。

該上清に50 µlのNaClおよび1 mlの冷エタノールを加え、-80℃で10分間冷やした後、4℃、15,000 rpm (18,500 x g)で10分間遠心分離し、沈殿(DNA)を回収した。さらに該沈殿を0.5 mlの70%冷エタノールで洗浄した後、4℃、15,000 rpm (18,500 x g)で10分間遠心分離し、沈殿(DNA)を回収した。該沈殿を真空乾燥することにより、精製されたゲノムDNAを約5 µg取得した。

### ③ プローブの調製

アスペルギルス・フィキューム(*Aspergillus ficcum*) NRRL 3135 [Northern Regional Research Center, United State Department of Agriculture Peoria, Illinois U.S.A. (NRRL) より入手] の遺伝子をプローブとしてアスペルギルス・ニガーSK57のフィターゼをクローニングすることを検討した。

NRRL 3135株の全DNAは実施例1-①および②記載の方法に準じて調製した。

NRRL 3135株のフィターゼ構造遺伝子を増幅するために、配列番号6に示したセンス鎖プライマーおよび配列番号7に示したアンチセンス鎖プライマーをアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製380A・DNA合成機を用いて合成した。該センス鎖プライマー、アンチセンス鎖プライマーおよびNRRL 3135株のゲノムDNAを含む混合液100 µlを用いてPCRを行うことにより、フィターゼ構造遺伝子を増幅した。PCRは、92℃で1分間、45℃で2分間、72℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして2

5 サイクル行った。

pUC118を制限酵素EcoRIで切断した後、該切断部位に、制限酵素EcoRIで処理したPCR増幅フィターゼ構造遺伝子断片を、宝酒造社製のライゲーションキットを用いて、挿入した。

フィターゼ構造遺伝子断片の挿入された、該プラスミドを用い、大腸菌JM109（宝酒造社より購入）を常法に従って形質転換した。

該形質転換した大腸菌を50  $\mu$ g/mlアンピシリンナトリウムを含むLB培地（トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、塩化ナトリウム 1%）を用いて、37℃、一昼夜培養した。

該培養菌体より、常法に従ってプラスミドを抽出し、該プラスミドをEcoRIで消化して、1.7 kbのDNAフラグメントを回収した。

該1.7 kbのDNAフラグメントをプローブとして用いた。

#### ④ サザンハイブリダイゼーション

SK57株の染色体DNA 20  $\mu$ gに、制限酵素XbaI（宝酒造社製）12 Uを添加し、37℃、12時間反応させ、該DNAを切断後、該DNAをアガロースゲル電気泳動にかけた。実施例1-③で得たプローブを用い、イーシーエル（ECL）キット（アマシャム社製）を用いて、添付の説明書記載の方法に従って以下のように、サザンハイブリダイゼーションを行った。

アガロースゲル電気泳動後、0.4 N水酸化ナトリウム溶液中で、Hybond-N<sup>+</sup>膜（アマシャム社製）にキャピラリーブロッティングした後、膜を風乾した。該膜をECL直接核酸標識及び検知システム（direct nucleic acid labelling and detection systems）（アマシャム社製）のハイブリダイゼーション・バッファー〔0.5 M NaClおよび5% ブロッキング試薬を含む〕10 ml中に42℃、1時間浸した後、プローブ溶液〔実施例1-③で得たプローブ3  $\mu$ lに滅菌水7  $\mu$ lを加え95℃、5分間保温後、氷中5分間放置し、10  $\mu$ lのラベリング溶液と10  $\mu$ lグルタルアルデヒド溶液を加え、37℃、10分間保温した溶液〕30

μlをブロッティング膜を浸したハイブリダイゼーション・バッファーに添加し、42℃、一晩振とうした。

該膜を一次洗浄液〔6M 尿素、0.4% SDS、0.5xSSC (150mM 塩化ナトリウムおよび15mM クエン酸ナトリウムよりなるSSC溶液の0.5倍濃度の組成よりなる溶液)〕100mlを用いて、42℃で20分間洗浄した。洗浄後、該膜を二次洗浄液〔0.4% SDS、0.5xSSC〕100mlを用いて、55℃で10分間洗浄し、再度該洗浄操作を行った。洗浄後、該膜を2xSSC 100mlを用いて、室温で5分間洗浄し、再度該洗浄操作を行った。

該洗浄膜を1分間風乾した後、7ml検出試薬に1分間浸し、素早くサララップに包んだ。これをX線フィルムカセットに入れ、X線フィルム（フジフィルム社製）を用いて室温で5分間露光した。

約4.6kbの位置にプローブと強くハイブリダイズするDNA断片を検出した。

⑤ アスペルギルス・ニガーSK57株の染色体DNAライブラリーの作成

SK57染色体DNA 10μgに制限酵素XbaI 12Uを添加し、37℃、12時間反応させ、該DNAを切断後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけた。泳動後、4.6kb付近のDNA断片をゲルから切り出し、ジンクリーン（GENECLEAN、BIO 101 社製）を用いて、約100ngの4.6kb付近のDNA断片を取得した。

大腸菌ベクターpUC118（宝酒造社より購入）200ngに、制限酵素XbaI 12Uを添加し、37℃、1時間反応させ、pUC118の切断処理を行った。

該切断処理液にアルカリフォスファターゼを1U添加し、37℃で30分間反応させた後、20μlのフェノール処理溶液を加え、緩やかに攪拌した後、4℃、15,000rpm (18,500xg)で10分間遠心分離し、上清を新しい遠



心管に回収した。この操作を2回繰り返し、上清を新しい遠心管に回収した。

該上清に2  $\mu$  l の3 M酢酸ナトリウム溶液および50  $\mu$  l の冷エタノールを加え、 $-80^{\circ}\text{C}$  で10分間冷やした後、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15,000 rpm (18,500 x g) で10分間遠心分離し、沈殿 (DNA) を回収した。

該沈殿を真空乾燥した後、10  $\mu$  l のTE緩衝液を加え、沈殿物を溶解し切断断片を調製した。

該切断断片の切断部位に上記4.6 kb付近のDNA断片をT4リガーゼ (宝酒造社製) を用いて挿入し、アスベルギルス・ニガーSK57の染色体DNA断片が組み込まれたプラスミドを得た。

該プラスミドを用い、大腸菌JM109 (宝酒造社より購入) を常法にしたがって形質転換した。

該形質転換した大腸菌を50  $\mu$  g/mlアンピシリンナトリウムを含むLB培地を用いて、 $37^{\circ}\text{C}$ 、一昼夜培養した。レプリカを作製するために、さらに、50  $\mu$  g/mlアンピシリンナトリウムを含むLB寒天培地 (LB培地に寒天を2%添加した培地) を用いて、 $37^{\circ}\text{C}$ 、一昼夜培養した。生育してきたコロニーをSK57の染色体DNAライブラリーとして用いた。

#### ⑥ 染色体DNAライブラリーから目的とするDNAを持つコロニーの単離

実施例1-⑤で作製したライブラリーから新規フィターゼ遺伝子を持つコロニーを単離するために、ライブラリーのコロニーをメンブレンフィルターに移し取り、ECLキットに従い、実施例1-③で得たプローブを用いて、常法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行った。数千のコロニーを対象にハイブリダイゼーションを行い、ポジティブコロニーを単離した。

#### ⑦ 制限酵素地図の作成および塩基配列の決定

実施例1-⑥で取得したポジティブコロニーより、常法に従ってプラスミドを抽出した。該プラスミドをpANPHY1と命名した。pANPHY1プラスミドを種々の制限酵素で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、切断断片の長さ

から、SK 57の染色体DNA由来のXba I 処理挿入断片に関する制限酵素地図を作成した(第1図)。挿入断片は4.6 kbであった。

また、pANPHY1プラスミドを各種制限酵素で消化後、アガロースゲル電気泳動によって分離後、ナイロンメンブレンフィルターにブロッティングした。ECLキットに従い、実施例1-③で取得したプローブを用い、サザンハイブリダイゼーションを行った。該プローブがハイブリダイズする部位は、挿入断片のほぼ中央に位置していた。pANPHY1の制限酵素地図および新規フィターゼコード領域を第2図に示した。

pANPHY1に挿入された新規フィターゼ遺伝子の全ヌクレオチド配列をダイデオキシチェーンターミネーション法により決定した。該配列を配列番号4に示した。

#### 〔実施例2〕 新規フィターゼをコードするDNAのイントロンの解析

実施例1で取得した新規フィターゼをコードする染色体由来のDNAにおけるイントロン領域を、以下の方法でアスペルギルス・ニガーSK 57株よりフィターゼのcDNAを取得することにより解析した。

##### ①アスペルギルス・ニガーSK 57株の培養

培地はCzapex-Doxを基本として、0.05% 硫酸マグネシウム、0.001% 硫酸第一鉄、0.05% 塩化カリウム、0.2% 硝酸ナトリウム、1% グルコース、0.1% コーンスティーブリカー(サンエイ糖化製)を50mM MES緩衝液に溶解し、500mlのバッフル付フラスコに100mlずつ分注し、オートクレーブ滅菌(120℃、20分)した。滅菌後、SK-57株をスラントから一白金耳植菌し、28℃、200rpmで5日間振とう培養した後、菌体をガラスフィルターと吸引ピンを用いて採集し、RNaseの活性を抑えるため液体窒素により急速に凍結させ、使用するまで-80℃で保存した。

## ② RNAの抽出

上記①で取得した凍結菌体1gを液体窒素を注ぎながら素早く擦りつぶして粉末状にし、50℃に保温した10mlのニッポンジーンの抽出液ISOGENに入れ、30秒間強く振とうした。

該液を50℃で10分間保温した後、1mlずつエッペンドルフチューブに分注した。

該分注液に200μlずつクロロホルムを添加して振り混ぜ、4℃、15,000rpmで15分間遠心し、上層の水相を採取した。

該水相に4M 塩化リチウムを500μl添加して混ぜ合わせ、-80℃で1時間放置した後、4℃、15,000rpmで15分間遠心し、得られた沈殿をRNaseを含有しない滅菌水（以下、RNase-free水と略す）0.4mlに溶解した。

該溶液に0.4mlのイソプロピルアルコールを添加して混ぜ合わせ、4℃で30分間放置した後、再び4℃、15,000rpmで15分間遠心し、沈殿を得た。

該沈殿を75%エタノールで洗浄し、真空遠心機で適度に乾燥させた後、RNase-free水0.4mlに溶解した。

該溶解液に1mlのエタノールを添加し、遠心分離することにより、再度沈殿を得た。

該沈殿を75%エタノールで洗浄後、最終的に全体で0.4mlのRNase-free水に溶解し、RNAサンプルとして用いた。

## ③ RT-PCR法によるフィターゼのcDNAの増幅

TOYOBOのRT-PCR Kitを用い、以下の方法でフィターゼのcDNAの増幅を行った。

### (1) 逆転写反応

上記②で調製したRNAサンプル1μg相当をエッペンドルフチューブに入れ、

RNase-free水を添加し、10  $\mu$ lに調製する。

該調製液にTOYOBOのRT-PCR Kitに付属の5×RTase Buffer 4  $\mu$ l、Random Primer 1  $\mu$ l、RNase Inhibitor 1  $\mu$ l、RTase 2  $\mu$ lを加え、パーキンエルマーPJ2000サーマルサイクラーを用いて30℃で10分間、42℃で20分間、99℃で5分間、4℃で5分間反応させた。

## (2) PCR

上記(1)で得られた反応のサンプル20  $\mu$ lにTOYOBOのRT-PCR Kitに付属のPlus Buffer 10  $\mu$ l、滅菌水 68  $\mu$ l、センスプライマー 0.5  $\mu$ l、アンチセンスプライマー 0.5  $\mu$ l、rTaq DNA polymerase 1  $\mu$ lを加えて計100  $\mu$ lとし、94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で90秒間の反応工程を1サイクルとして35サイクル行い、cDNAを増幅した。

反応後、該反応液にクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を100  $\mu$ l加えて振り混ぜ、15,000 rpmで5分間遠心し、上層を採取してcDNAサンプルとした。

該cDNAサンプルを用いて、cDNAを解析した結果、配列番号4に示された塩基配列にはイントロン(44から155)が一箇所含まれていることがわかった。該配列は、配列番号2に示されるアミノ酸をコードしており、後述の精製された新規フィターゼ蛋白のアミノ酸配列(配列番号1)より、該アミノ酸配列のN末から24番目までのアミノ酸は分泌シグナルペプチドに相当することがわかった。

## 〔実施例3〕 新規フィターゼ発現形質転換体の取得

以下の方法により、アスペルギルス・ニガーSK57株、アスペルギルス・ニデュランスMD-4株またはアスペルギルス・オリゼM-23株を宿主とした新規フィターゼ発現組換え体を取得した。

宿主となる菌株(アスペルギルス・ニガーSK57、アスペルギルス・ニデュランスMD-4またはアスペルギルス・オリゼM-23)をDPY培地(2%

デキストリン、1% ペプトン、0.5% 酵母エキスを、0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH 5.5) を用いて30℃、2～3日間振とう培養した。生育した菌体を3G1ガラスフィルターを用いて集菌し、滅菌水で洗浄した。

該洗浄菌体を、フィルター滅菌した10mlのプロトプラスト調製用溶液〔5mg/ml ノボザイム234、5mg/ml セルラーゼR-10、0.8M NaCl、10mM リン酸緩衝液(pH 6.0)〕に加え、30℃で3時間静かに振とうした。3G3ガラスフィルターを用いて未分解の菌糸を除去し、取得したろ液を700xg (2,000rpm) で5分間遠心分離してプロトプラストを取得した。

該プロトプラストを0.8M NaClで2回、溶液I〔0.8M NaCl、10mM  $\text{CaCl}_2$ 、50mM Tris-HCl (pH 7.5)〕で1回洗浄し、最終濃度が $2.5 \times 10^8$ 個/mlとなるように4/5量の溶液Iに懸濁した。該懸濁液に1/5量の溶液II〔40% (w/v) PEG 4000、50mM Tris-HCl (pH 7.5)〕を加え形質転換に用いるプロトプラスト懸濁液を調製した。

該プロトプラスト懸濁液において、アスペルギルス・ニガーSK57株またはアスペルギルス・ニデュランスMD-4株由来の場合には、プロトプラスト懸濁液0.2mlにプラスミドpANPHY1を20 $\mu$ l、あるいは、pANPHY1 10 $\mu$ lおよびp3SR2 10 $\mu$ lを加え氷中で30分間放置後、1mlの溶液IIを加えて室温で20分間放置した。放置後、溶液Iを10ml添加し、該液を700xgで5分間遠心分離し、沈殿画分を得た。該沈殿画分を0.2mlの溶液Iに懸濁した。該懸濁液を0.8M NaClを含むCD平板培地(1% スクロース、10mM アセトアミド、0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% KCl)に塗布し、0.5%の寒天を含む培地を重層し、30℃で5～10日間培養した。

上記プロトプラスト懸濁液において、アスペルギルス・オリゼM-23由来の場合には、プロトプラスト懸濁液0.2mlにpANPHY1 10 $\mu$ lおよびpSal23 1.0 $\mu$ lを加え氷中で30分間放置後、1mlの溶液IIを加えて室温で20分間放置した。放置後、溶液Iを10ml添加し、該液を700xgで5分間遠心分離し、沈殿画分を得た。該沈殿画分を0.2mlの溶液Iに懸濁した。該懸濁液を0.8M NaClを含む最少平板培地（1% スクロース、0.3% NaNO<sub>3</sub>、0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.05% KCl、pH 5.5）に塗布し、0.5%の寒天を含む該培地を重層し、30℃で5～10日間培養した。

該培養において、生育が旺盛な株を形質転換体として選択し、各形質転換体のフィターゼ活性を測定し、活性の高かった、アスペルギルス・ニガーMH-PA1株、アスペルギルス・ニデュランスM-PA1株およびアスペルギルス・オリゼMO-PG3株を取得した。アスペルギルス・ニガーMH-PA1株およびアスペルギルス・ニデュランスM-PA1株は、平成8年1月25日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）にそれぞれFERM BP-5372およびFERM BP-5373として寄託されている。

#### 〔実施例4〕 形質転換体によるフィターゼの製造

##### ① アスペルギルス・ニガーMH-PA1株によるフィターゼの製造

10gの小麦フスマを入れ綿栓をした500ml容三角フラスコを120℃で20分間滅菌した後、滅菌水8mlを加えた。該培地にMH-PA1株を植菌した後、フラスコを振ることによりMH-PA1株の菌糸と小麦フスマを充分混合し、30℃で4～5日間静置培養した。

約37℃の温水100mlを培養後のフラスコに加え、37℃で1～2時間放置した。放置後、No. 2のろ紙を用いて固形分と液体を分離し、新規フィターゼを560U取得した。MH-PA1株は実施例6-①に示したSK57株の約

2. 4 倍の生産量を示した。

② アスペルギルス・ニデュランス M-P A 1 株によるフィターゼの製造

10 ml のフィターゼ生産培地 (1% スクロース、0.2%  $\text{NaNO}_3$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05%  $\text{KCl}$ 、0.001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% C.S.L.、pH 5.5) を入れシリコン栓をした 100 ml 容三角フラスコを 120℃ で 20 分間滅菌した。該培地に M-P A 1 を植菌した後、30℃ で 4～5 日間振とう培養した。

宿主アスペルギルス・ニデュランス MD-4 株は同条件で 5 mU のフィターゼ生産量であったのに対し形質転換体 M-P A 1 株は 90 mU 生産しており、宿主菌株の約 18 倍の生産量であった。

③ アスペルギルス・オリゼ MO-P G 3 株によるフィターゼの製造

500 ml のフィターゼ生産培地を入れ綿栓をした 2 L 容三角フラスコを 120℃ で 20 分間滅菌した。該培地に MO-P G 3 株を植菌した後、28℃ で 4～5 日間振とう培養した。

宿主アスペルギルス・オリゼ M-23 株は同条件で 13 mU/ml のフィターゼ生産量であったのに対し形質転換体 MO-P G 3 株は 370 mU/ml 生産しており、宿主菌株の約 29 倍の生産量であった。

〔実施例 5〕 アスペルギルス・ニガー SK 57 株から新規フィターゼ高生産変異株アスペルギルス・ニガー SK 92 株の取得

アスペルギルス・ニガー SK 57 株を最少寒天培地 (2% シュクロース、0.3% 硝酸ナトリウム、0.05% 塩化カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、2% 寒天、pH 5.5) 上で生育させ、胞子を形成させた。該胞子を滅菌水 10 ml に懸濁した。最終  $10^7$  胞子/ml となるように滅菌水で調製し、該胞子懸濁液 10 ml を用いて変異処理を行った。胞子懸濁液に死滅率 99% となるように紫外線および  $\gamma$  線を照射して変異を誘発した。該変異処理によりフィターゼ高生産株を 1 株取得した。該変異株に該変異処理をさらに 7 回繰り返すこと

により、新規フィターゼ高生産株アスペルギルス・ニガーSK92株を取得した。

〔実施例6〕 アスペルギルス・ニガーSK57株およびアスペルギルス・ニガーSK92株を用いた新規フィターゼの製造

① SK57株およびSK92株による新規フィターゼの製造

10gの小麦フスマを入れ綿栓をした500ml容三角フラスコを120℃で20分間滅菌した後、滅菌水8mlを加えた。該培地にSK57株またはSK92株を植菌した後、フラスコを振ることにより菌糸と小麦フスマを充分混合し、30℃で4～5日間静置培養した。

約37℃の温水100mlを培養後のフラスコに加え、37℃で1～2時間放置した。放置後、No. 2のろ紙を用いて固形分と液体を分離した。

該製造により、SK57株で新規フィターゼを230U、SK92株で1000Uの新規フィターゼを取得した。

SK92株の生産する新規フィターゼの生産量は、SK57株の約4.5倍であった。

② SK57株による新規フィターゼの製造

120℃、30分間空蒸した小麦フスマ7,500kgに、予め純粹培養したSK57株を移植し、菌糸とフスマ培地が均一になるように混合機を用いて充分混合した。

該混合物を滅菌した600x1,000mmのアルミニウムトレイに5kgずつ1,500枚に盛り込み、温度30℃、湿度100%の培養室で5日間放置しSK57株を培養した。

該培養物を抽出槽に移し18トンの温水を散布してフィターゼ抽出液を25トンタンクに回収した。該抽出液を真空濃縮タンク（日本真空株式会社製）に移送し、2～3倍に真空濃縮した後、95%冷エタノールを3.5トン加えた。該操作により不溶化した不純物をプレスろ過機により除去した。

得られたろ液を無菌フィルター（0.45μm、日本ロスイ機社製）を用いて



ろ過した後、再び95%冷エタノールを17.5トン加え、新規フィターゼを不溶化させた。該不溶化フィターゼを沈降させ、新規フィターゼを含む沈降画分を3トン取得した。

該沈降画分に95%冷エタノールを8トン添加し脱水後、該不溶化フィターゼを沈降させ、新規フィターゼを含む沈降画分を3トン取得した。該脱水・沈降操作を2～3回繰り返した後、真空乾燥し、フィターゼ酵素原末1.5億U取得した。

#### 〔実施例7〕 新規フィターゼの精製

##### ① アスベルギルス・ニガーSK57株の生産する新規フィターゼの精製

実施例6-②で取得したフィターゼ酵素原末10gを酢酸緩衝液A〔50mM酢酸/50mM酢酸ナトリウム(pH5.5)〕50mlに溶解した後、ウルトラフィルター(ザルトリウス社、排除分子量1万)により脱塩した。得られた酵素液を予め50mM酢酸緩衝液Aで平衡化したダイアイオンHPA-75(三菱化成社)カラム(5.6cm x 30cm)に通塔した。酢酸緩衝液Aで洗浄後、0.3MNaClを含む酢酸緩衝液B〔50mM酢酸/50mM酢酸ナトリウム(pH4.8)〕を用いて新規フィターゼを溶出した。該溶出画分をウルトラフィルター(アドバンテック社、排除分子量1万)により20倍に濃縮した後、予め酢酸緩衝液C〔50mM酢酸/50mM酢酸ナトリウム(pH4.9)〕で平衡化したS-セファロースFF(2.5cm x 30cm、ファルマシア社製)カラムに通塔した。酢酸緩衝液Cで洗浄した後、酢酸緩衝液D〔50mM酢酸/50mM酢酸ナトリウム(pH5.2)〕により蛋白質を溶出し、フィターゼ画分を得た。得られた酵素液をウルトラフィルター(アドバンテック社、排除分子量1万)により20倍に濃縮した後、予め酢酸緩衝液E〔50mM酢酸/50mM酢酸ナトリウム(pH4.5)〕で平衡化したトヨパールHW-55F(東ソー社)カラムに通塔した。酢酸緩衝液Eを用いて新規フィターゼを溶出した。該溶出画分を、予め25mM Histidine-HCl緩衝液〔pH5.8、フ

ファルマシア社製〕で平衡化したmono P H R 5 / 2 0 カラム（ファルマシア社製）に通塔し、1 0 % Polybuffer74-H C l（p H 4 . 2、ファルマシア社製）を用いて新規フィターゼを溶出した。

以上のステップにより、新規フィターゼは比活性 1 5 8 U / m g まで精製された。

② アスベルギルス・ニガーMH-P A 1 株およびアスベルギルス・ニデュランスM-P A 1 株の生産する新規フィターゼの精製

実施例 6 - ①に記載の方法に準じて、MH-P A 1 株およびM-P A 1 株を培養し、各々の培養液よりNo. 2 のろ紙を用いて液体画分（新規フィターゼ粗酵素液）を取得した。

該粗酵素液各々について、5 0 m M 酢酸緩衝液 A（p H 5 . 5）を加え、ウルトラフィルター（アドバンテック社、排除分子量 1 万）を用いて脱塩した。

該脱塩した酵素液をあらかじめ 5 0 m M 酢酸緩衝液（p H 5 . 5）で平衡化したダイヤイオンH P A - 7 5 カラム（5 . 6 c m x 3 0 c m）に通塔した。酢酸緩衝液 A で洗浄後、0 . 3 M N a C l を含む酢酸緩衝液 B（p H 4 . 8）を用いて新規フィターゼを溶出した。

該溶出画分をウルトラフィルター（アドバンテック社、排除分子量 1 万）を用いて濃縮した後、透析を行った。得られたフィターゼ画分をあらかじめ 5 0 m M 酢酸緩衝液 E（p H 4 . 5）で平衡化したトヨパールH W - 5 5 F カラム（2 . 0 c m x 6 0 c m）に通塔し、酢酸緩衝液 E で新規フィターゼを溶出した。

以上のステップにより、アスベルギルス・ニガーMH-P A 1 株およびアスベルギルス・ニデュランスM-P A 1 株の生産する新規フィターゼを精製した。

③ アスベルギルス・オリゼMO-P G 3 株の生産する新規フィターゼの精製

実施例 4 - ③の培養で得られた培養液から遠心分離により菌体を除去し、得られた培養上清を粗酵素液として用いた。

粗酵素液に 5 0 m M 酢酸緩衝液 A（p H 5 . 5）を加え、ウルトラフィルタ

ー（アドバンテック社、排除分子量1万）を用いて脱塩した。

該脱塩した酵素液をあらかじめ50 mM 酢酸緩衝液A（pH 5.5）で平衡化したダイヤイオンHPA-75カラム（5.6 cm x 30 cm）に通塔した。酢酸緩衝液Aで洗浄した後、0.3 M NaClを含む酢酸緩衝液B（pH 4.8）を用いて新規フィターゼを溶出した。

該溶出画分をウルトラフィルター（アドバンテック社、排除分子量1万）を用いて濃縮した後、透析を行った。得られたフィターゼ画分をあらかじめ50 mM 酢酸緩衝液E（pH 4.5）で平衡化したトヨパールHW-55Fカラム（2.0 cm x 60 cm）に通塔し、酢酸緩衝液Eにてフィターゼを溶出した。

以上のステップにより、アスペルギルス・オリゼMO-PG3株の生産する新規フィターゼを精製した。

#### 〔実施例8〕 新規フィターゼの物理化学的性質

実施例7-①～③で精製取得した新規フィターゼの物理化学的性質を以下に示す。

① Km値；0.00625～1.25 mMの範囲で基質濃度を変化させ、標準活性測定法に従い活性を測定した。得られた結果をラインウィーバー・バークプロットし、Km値を算出した。

アスペルギルス・ニガーSK57株、アスペルギルス・ニガーMH-PA1株、アスペルギルス・ニデュランスM-PA1株およびアスペルギルス・オリゼMO-PG3株由来の新規フィターゼのKm値は、それぞれ13、30、20および28  $\mu$ Mであった。

同条件で測定したアスペルギルス・フィカムNRRL3135株由来のフィターゼのKm値は197  $\mu$ Mであり、本発明の新規フィターゼはこれまで知られているフィターゼよりも一桁低いKm値を有する優れたフィターゼであった。

② 分子量（SDS-PAGE法）；実施例7-①、②または③で精製取得した新規フィターゼの試料40 mlに10 mlのサンプルバッファー（4% 2-メ

ルカプトエタノール、80% グリセリン、4% SDS、40mM トリス-塩酸緩衝液 pH 6.8) を加え2分間煮沸した。12.5% アクリルアミドゲルを用いてAE-6200型電気泳動装置(アトー社)により泳動した。蛋白の染色にはクマシブリリアントブルーG250を用いた。また、エンドグリコシダーゼHによる糖鎖の除去処理を行った試料も同様に泳動した。

アスペルギルス・ニガーSK57株由来の新規フィターゼのSDS-PAGEの写真を第3図に示した。該SDS-PAGEによる分子量測定で、SK57株およびMH-PA1株由来の新規フィターゼの分子量は約60kDaであった。これら新規フィターゼは、エンドグリコシダーゼHによる糖鎖の除去処理を行っても分子量はほとんど変化しなかった。配列番号1、2から求められる分子量は約50kDaであり、SDS-PAGEから得られた値とほぼ一致していた。

また、アスペルギルス・ニデュランスM-PA1株およびアスペルギルス・オリゼMO-PG3株由来の新規フィターゼのSDS-PAGEによる分子量測定結果を第4図に示した。該測定による両菌株由来の新規フィターゼの分子量は約90~100kDaであった。エンドグリコシダーゼH処理したこれら新規フィターゼの分子量は、SK57株、MH-PA1株由来の新規フィターゼの分子量と同じ、約60kDaとなったことより、M-PA1株およびMO-PG3株由来の新規フィターゼには糖鎖が付加していることがわかった。

③ 至適pH; 下記に示す0.2M 緩衝液を用いて各pHにおける活性を、標準活性測定法に準じて測定した。

- pH 2~4 : グリシン/塩酸緩衝液
- pH 4~5.5 : 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液
- pH 5.5~7 : MES緩衝液 (Good Buffer)
- pH 7~8 : MOPS緩衝液 (Good Buffer)
- pH 8~9 : Tris/塩酸緩衝液

結果を第5図に示した。本発明の新規フィターゼはpH 5.0~6.5で最大

活性を示した。また、pH 7.0 以上では不活性であった。

④ pH安定性；2.1mg/mlの新規フィターゼ溶液を、下記に示す100mM緩衝液で37℃、60分間保温した後、標準活性測定法に準じて、活性を測定した。

pH 2～4 : グリシン／塩酸緩衝液

pH 4～5.5 : 酢酸／酢酸ナトリウム緩衝液

pH 5.5～7 : MES緩衝液 (Good Buffer)

pH 7～8 : MOPS緩衝液 (Good Buffer)

pH 8～9 : Tris／塩酸緩衝液

結果を第6図に示した。

アスペルギルス・ニガーSK57株およびMH-PA1株由来の新規フィターゼは、pH 4.5～7.5の範囲において、約60%以上の残存活性を有していた。

アスペルギルス・ニデュランスM-PA1株およびアスペルギルス・オリゼMO-PG3株由来の新規フィターゼは、pH 8以下において、約70%以上の残存活性を有していた。

⑤ 至適温度；反応温度0～70℃における活性を、標準活性測定法に準じて測定した。

結果を第7図に示した。本発明の新規フィターゼは40～65℃で最大活性を示した。

⑥ 温度安定性；2.1mg/mlの蛋白質濃度の酵素溶液を100mM酢酸／酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)中、0～60℃で60分間保温した後、標準活性測定法に準じて、活性を測定した。

結果を第8図に示した。

アスペルギルス・ニガーSK57株およびアスペルギルス・ニガーMH-PA1株由来の新規フィターゼは、30℃以下において70%以上の相対活性を示し

た。

アスペルギルス・ニデュランスM-P A 1 およびアスペルギルス・オリゼMO-P G 3 株由来の新規フィターゼは、50℃まで安定であり、それ以上では徐々に失活した。上記実施例8-①に示したように、アスペルギルス・ニデュランスM-P A 1 およびアスペルギルス・オリゼMO-P G 3 株由来の新規フィターゼには糖鎖が付加してしているため、アスペルギルス・ニガーSK 5 7 株およびアスペルギルス・ニガーMH-P A 1 株由来の新規フィターゼより温度安定性が高いと考えられる。

⑦ 基質特異性；1 mM および 10 mM に調製した各基質を用い、標準活性測定法に準じて、活性を測定した。

アスペルギルス・ニガーSK 5 7 株由来の新規フィターゼの結果を第1表に示した。第1表に記載の基質に対し、新規フィターゼは作用し基質特異性は低い、フィチン酸以外の基質に対してはほとんど活性を示さなかった。他の菌株由来の新規フィターゼについても同様の結果を得た。

第 1 表

基 質	濃度 (mM)	相対活性 (100%)
フィチン酸	1	100
p-ニトロフェニル フォスフェート	1 10	1.9 10
D-グルコース 6-フォスフェート	1 10	0.45 4.2
フラクトース 6-フォスフェート	1 10	0.15 0.93
D-ミオーイノシトール 1,4,5 -トリス-フォスフェート	1 10	0.71 5.8
グリセロリン酸	1 10	0.11 0.96
ATP	1 10	1.6 1.2

⑧ 等電点電気泳動；3%アクリルアミドゲル（Ampholine pH 3.5-10.0 ファルマシア社製）を用い、AE-3230型電気泳動装置（アトー社）により等電点電気泳動を行った。

アスペルギルス・ニガーSK57株由来の新規フィターゼの結果を第9図に示した。該フィターゼの等電点（pI）は4.7～5.4であった。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、フィチン酸に対するKm値が小さく安価なフィターゼ、該フィターゼをコードするDNA、該DNAを組み込んだ組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する微生物および該微生物を用いたフィターゼの製造法を提供することができる。そして、このフィチン酸を飼料に用いて、飼料中に含まれる抗栄養因子としてのフィチン酸を分解し、飼料の栄養価値を向上させると共に、該分解により遊離したリン酸の効率よい利用を可能とさせることができる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 443

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質

ハイボセティカル : Yes

## 配列

```

Ser Arg Asn Gln Ser Thr Cys Asp Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys
 1           5           10           15
Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser
          20           25           30
Leu Ala Asn Lys Ser Ala Ile Ser Pro Asp Val Pro Ala Gly Cys His
        35           40           45
Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr
        50           55           60
Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln
        65           70           75           80
Asn Ala Thr Thr Phe Glu Gly Lys Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn
          85           90           95
Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu
          100           105           110
Val Asn Ser Gly Val Lys Phe Tyr Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg
          115           120           125
Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala
          130           135           140

```



Ser Gly Asn Lys Phe Ile Glu Gly Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp  
 145                      150                      155                      160  
 Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile  
                          165                      170                      175  
 Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr  
                          180                      185                      190  
 Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr  
                          195                      200                      205  
 Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser  
                          210                      215                      220  
 Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys  
 225                      230                      235                      240  
 Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro  
                          245                      250                      255  
 Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu  
                          260                      265                      270  
 Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly  
                          275                      280                      285  
 Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr  
                          290                      295                      300  
 His Ser Pro Val His Asp Asp Thr Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser  
 305                      310                      315                      320  
 Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser  
                          325                      330                      335  
 His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn  
                          340                      345                      350

Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr  
 355 360 365  
 Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr  
 370 375 380  
 Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val  
 385 390 395 400  
 Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala  
 405 410 415  
 Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala  
 420 425 430  
 Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu Cys Phe Ala  
 435 440

配列番号： 2

配列の長さ： 443

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

ハイボセティカル：Yes

配列

Ser Xaa Xaa Gln Ser Thr Cys Asp Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser  
 20 25 30  
 Leu Ala Asn Lys Ser Ala Ile Ser Pro Asp Val Pro Ala Gly Cys His  
 35 40 45

Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr  
 50 55 60  
 Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln  
 65 70 75 80  
 Asn Ala Thr Thr Phe Glu Gly Lys Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn  
 85 90 95  
 Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu  
 100 105 110  
 Val Asn Ser Gly Val Lys Phe Tyr Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg  
 115 120 125  
 Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala  
 130 135 140  
 Ser Gly Asn Lys Phe Ile Glu Gly Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile  
 165 170 175  
 Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr  
 180 185 190  
 Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr  
 195 200 205  
 Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser  
 210 215 220  
 Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys  
 225 230 235 240  
 Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro  
 245 250 255

Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu  
 260 265 270  
 Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly  
 275 280 285  
 Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr  
 290 295 300  
 His Ser Pro Val His Asp Asp Thr Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser  
 325 330 335  
 His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn  
 340 345 350  
 Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr  
 355 360 365  
 Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr  
 370 375 380  
 Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val  
 385 390 395 400  
 Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala  
 405 410 415  
 Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala  
 420 425 430  
 Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu Cys Phe Ala  
 435 440

配列番号 : 3

配列の長さ： 467

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

ハイポセティカル：Yes

配列

Met	Gly	Val	Ser	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Tyr	Leu	Leu	Ser	Gly	Val
1				5					10					15	
Thr	Ser	Gly	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ser	Arg	Asn	Gln	Ser	Thr	Cys	Asp
			20					25					30		
Thr	Val	Asp	Gln	Gly	Tyr	Gln	Cys	Phe	Ser	Glu	Thr	Ser	His	Leu	Trp
		35					40					45			
Gly	Gln	Tyr	Ala	Pro	Phe	Phe	Ser	Leu	Ala	Asn	Lys	Ser	Ala	Ile	Ser
	50					55					60				
Pro	Asp	Val	Pro	Ala	Gly	Cys	His	Val	Thr	Phe	Ala	Gln	Val	Leu	Ser
	65				70					75				80	
Arg	His	Gly	Ala	Arg	Tyr	Pro	Thr	Asp	Ser	Lys	Gly	Lys	Lys	Tyr	Ser
			85					90					95		
Ala	Leu	Ile	Glu	Glu	Ile	Gln	Gln	Asn	Ala	Thr	Thr	Phe	Glu	Gly	Lys
		100						105					110		
Tyr	Ala	Phe	Leu	Lys	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ala	Asp	Asp	Leu
		115					120					125			
Thr	Pro	Phe	Gly	Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asn	Ser	Gly	Val	Lys	Phe	Tyr
		130				135					140				
Gln	Arg	Tyr	Glu	Ser	Leu	Thr	Arg	Asn	Ile	Val	Pro	Phe	Ile	Arg	Ser
145					150					155				160	

Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala Ser Gly Asn Lys Phe Ile Glu Gly  
 165 170 175  
 Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser  
 180 185 190  
 Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn  
 195 200 205  
 Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala  
 210 215 220  
 Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg  
 225 230 235 240  
 Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser  
 260 265 270  
 Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu  
 275 280 285  
 Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly  
 290 295 300  
 His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr His Ser Pro Val His Asp Asp Thr  
 325 330 335  
 Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn  
 340 345 350  
 Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile  
 355 360 365

Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr  
 370 375 380  
 Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr  
 385 390 395 400  
 Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser  
 405 410 415  
 Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro  
 420 425 430  
 Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser  
 435 440 445  
 Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu  
 450 455 460  
 Cys Phe Ala  
 465

配列番号 : 4

配列の長さ : 1332

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

TCG	AGA	AAT	CAA	TCC	ACT	TGC	GAT	ACG	GTC	GAT	CAG	GGG	TAT	CAA	TGC	48
Ser	Arg	Asn	Gln	Ser	Thr	Cys	Asp	Thr	Val	Asp	Gln	Gly	Tyr	Gln	Cys	
1				5					10					15		
TTC	TCG	GAG	ACT	TCG	CAT	CTT	TGG	GGC	CAA	TAC	GCG	CCG	TTC	TTT	TCT	96

Phe	Ser	Glu	Thr	Ser	His	Leu	Trp	Gly	Gln	Tyr	Ala	Pro	Phe	Phe	Ser		
			20					25					30				
CTG	GCA	AAC	AAA	TCG	GCC	ATC	TCC	CCT	GAT	GTT	CCT	GCC	GGA	TGC	CAT	144	
Leu	Ala	Asn	Lys	Ser	Ala	Ile	Ser	Pro	Asp	Val	Pro	Ala	Gly	Cys	His		
		35					40					45					
GTC	ACT	TTC	GCC	CAG	GTT	CTC	TCC	CGC	CAT	GGA	GCA	CGG	TAT	CCG	ACC	192	
Val	Thr	Phe	Ala	Gln	Val	Leu	Ser	Arg	His	Gly	Ala	Arg	Tyr	Pro	Thr		
		50				55					60						
GAC	TCC	AAG	GGC	AAG	AAA	TAC	TCC	GCT	CTC	ATC	GAG	GAG	ATC	CAG	CAG	240	
Asp	Ser	Lys	Gly	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ile	Glu	Glu	Ile	Gln	Gln		
		65			70					75				80			
AAC	GCG	ACA	ACC	TTC	GAG	GGG	AAA	TAT	GCC	TTC	CTG	AAG	ACA	TAC	AAC	288	
Asn	Ala	Thr	Thr	Phe	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ala	Phe	Leu	Lys	Thr	Tyr	Asn		
			85					90					95				
TAC	AGC	CTG	GGC	GCG	GAT	GAT	CTG	ACT	CCC	TTC	GGA	GAG	CAG	GAG	CTG	336	
Tyr	Ser	Leu	Gly	Ala	Asp	Asp	Leu	Thr	Pro	Phe	Gly	Glu	Gln	Glu	Leu		
		100						105					110				
GTC	AAC	TCC	GGC	GTC	AAG	TTC	TAC	CAG	CGA	TAC	GAA	TCG	CTC	ACA	AGA	384	
Val	Asn	Ser	Gly	Val	Lys	Phe	Tyr	Gln	Arg	Tyr	Glu	Ser	Leu	Thr	Arg		
		115						120					125				
AAC	ATT	GTC	CCG	TTC	ATC	CGA	TCC	TCA	GGC	TCC	AGC	CGC	GTG	ATT	GCC	432	
Asn	Ile	Val	Pro	Phe	Ile	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Arg	Val	Ile	Ala		
		130				135						140					
TCT	GGC	AAT	AAA	TTC	ATC	GAG	GGC	TTC	CAG	AGC	ACT	AAG	CTG	AAG	GAT	480	
Ser	Gly	Asn	Lys	Phe	Ile	Glu	Gly	Phe	Gln	Ser	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp		
145					150					155				160			



CCT CGT GCC CAG CCC GGC CAA TCG TCG CCC AAG ATC GAC GTG GTC ATT	528
Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile	
165 170 175	
TCA GAG GCC AGC ACA TCC AAC AAC ACT CTC GAT CCG GGC ACC TGC ACC	576
Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr	
180 185 190	
GTT TTC GAA GAT AGC GAA TTG GCC GAT GAC ATC GAA GCC AAT TTC ACC	624
Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr	
195 200 205	
GCC ACG TTC GTC CCC TCC ATT CGT CAA CGT CTG GAG AAC GAC TTG TCT	672
Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser	
210 215 220	
GGC GTG TCT CTC ACG GAC ACA GAA GTG ACC TAC CTC ATG GAC ATG TGC	720
Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys	
225 230 235 240	
TCC TTC GAC ACC ATC TCC ACC AGC ACC GTC GAC ACC AAG CTG TCC CCC	768
Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro	
245 250 255	
TTC TGT GAC CTG TTC ACC CAT GAA GAA TGG ATC AAC TAC GAC TAC CTC	816
Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu	
260 265 270	
CAG TCC CTG AAC AAA TAC TAC GGC CAT GGC GCA GGT AAC CCG CTC GGC	864
Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly	
275 280 285	
CCG ACC CAG GGC GTC GGC TAC GCT AAC GAG CTC ATC GCC CGT CTC ACC	912
Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr	

290	295	300	
CAC TCG CCT GTC CAC GAT GAC ACC AGC TCC AAC CAC ACA TTG GAC TCC			960
His Ser Pro Val His Asp Asp Thr Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser			
305	310	315	320
AAC CCG GCT ACT TTC CCG CTC AAC TCC ACT CTC TAT GCG GAC TTT TCG			1008
Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser			
	325	330	335
CAT GAT AAC GGC ATC ATC TCT ATC CTC TTT GCT TTG GGT CTG TAC AAC			1056
His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn			
	340	345	350
GGC ACC AAG CCG CTG TCT TCC ACG ACC GCG GAG AAT ATC ACC CAG ACC			1104
Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr			
	355	360	365
GAT GGG TTC TCA TCT GCC TGG ACG GTT CCT TTC GCG TCG CGC ATG TAC			1152
Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr			
	370	375	380
GTC GAG ATG ATG CAA TGC CAG TCC GAG CAG GAG CCT TTG GTC CGT GTC			1200
Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val			
385	390	395	400
TTG GTT AAT GAT CGT GTT GTT CCG CTG CAT GGC TGT CCG GTT GAT GCT			1248
Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala			
	405	410	415
TTG GGA AGA TGT ACG CGG GAT AGC TTC GTG AAG GGG TTG AGC TTT GCC			1296
Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala			
	420	425	430
AGA TCT GGC GGT GAT TGG GGG GAG TGT TTC GCT TAG			1332

Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu Cys Phe Ala Ala

435

440

配列番号 : 5

配列の長さ : 1515

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

ハイボセティカル : YES

アンチセンス : YES

ゲノム内での位置

単位 : ゲノム %

配 列

ATG GGT GTC TCT GCC GTT CTA CTT CCT TTG TAC CTC CTG TCC GG 44

Met Gly Val Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Ser Gly

-20

-15

-10

GTATGCTAAT CATCCCTATC GGAGCCTGAT ATGGACCCTC CCCTTCCGAA GGCCCCCTGA 104

AGCTTGGA CTGTGGGACT ATTGATCTGA TCGCTGACAA TCTGTGCACA G A GTC 159

Val

ACC TCC GGA CTG GCA GTC CCC GCC TCG AGA AAT CAA TCC ACT TGC GAT 207

Thr Ser Gly Leu Ala Val Pro Ala Ser Arg Asn Gln Ser Thr Cys Asp

-5

1

5

ACG GTC GAT CAG GGG TAT CAA TGC TTC TCG GAG ACT TCG CAT CTT TGG 255

Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp

10

15

20

- 5 2 -

155	160	165	
TCG CCC AAG ATC GAC GTG GTC ATT TCA GAG GCC AGC ACA TCC AAC AAC	735		
Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn			
170	175	180	
ACT CTC GAT CCG GGC ACC TGC ACC GTT TTC GAA GAT AGC GAA TTG GCC	783		
Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala			
185	190	195	200
GAT GAC ATC GAA GCC AAT TTC ACC GCC ACG TTC GTC CCC TCC ATT CGT	831		
Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg			
205	210	215	
CAA CGT CTG GAG AAC GAC TTG TCT GGC GTG TCT CTC ACG GAC ACA GAA	879		
Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu			
220	225	230	
GTG ACC TAC CTC ATG GAC ATG TGC TCC TTC GAC ACC ATC TCC ACC AGC	927		
Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser			
235	240	245	
ACC GTC GAC ACC AAG CTG TCC CCC TTC TGT GAC CTG TTC ACC CAT GAA	975		
Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu			
250	255	260	
GAA TGG ATC AAC TAC GAC TAC CTC CAG TCC CTG AAC AAA TAC TAC GGC	1023		
Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly			
265	270	275	280
CAT GGC GCA GGT AAC CCG CTC GGC CCG ACC CAG GGC GTC GGC TAC GCT	1071		
His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala			
285	290	295	
AAC GAG CTC ATC GCC CGT CTC ACC CAC TCG CCT GTC CAC GAT GAC ACC	1119		

Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr His Ser Pro Val His Asp Asp Thr  
                   300                                  305                                  310  
 AGC TCC AAC CAC ACA TTG GAC TCC AAC CCG GCT ACT TTC CCG CTC AAC 1167  
 Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn  
                   315                                  320                                  325  
 TCC ACT CTC TAT GCG GAC TTT TCG CAT GAT AAC GGC ATC ATC TCT ATC 1215  
 Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile  
                   330                                  335                                  340  
 CTC TTT GCT TTG GGT CTG TAC AAC GGC ACC AAG CCG CTG TCT TCC ACG 1263  
 Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr  
                   345                                  350                                  355                                  360  
 ACC GCG GAG AAT ATC ACC CAG ACC GAT GGG TTC TCA TCT GCC TGG ACG 1311  
 Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr  
                   365                                  370                                  375  
 GTT CCT TTC GCG TCG CGC ATG TAC GTC GAG ATG ATG CAA TGC CAG TCC 1359  
 Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser  
                   380                                  385                                  390  
 GAG CAG GAG CCT TTG GTC CGT GTC TTG GTT AAT GAT CGT GTT GTT CCG 1407  
 Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro  
                   395                                  400                                  405  
 CTG CAT GGC TGT CCG GTT GAT GCT TTG GGA AGA TGT ACG CGG GAT AGC 1455  
 Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser  
                   410                                  415                                  420  
 TTC GTG AAG GGG TTG AGC TTT GCC AGA TCT GGC GGT GAT TGG GGG GAG 1503  
 Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu  
                   425                                  430                                  435                                  440

TGT TTC GCT TAG

1515

Cys Phe Ala

443

配列番号 : 6

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配 列

GGGAATTCAT GGGCGTCTCT GCTGTTCTAC TT

32

配列番号 : 7

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配 列

GGGAATTCCT AAGCAAAACA CTCCGCCCAA TC

32

## 請求の範囲

1. フィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が $10 \sim 30 \mu\text{M}$ であるフィターゼ。
2. フィターゼが、下記の物理化学的性質を有するフィターゼである、請求項1記載のフィターゼ。
  - ①分子量 (SDS-PAGE法) ; エンドグリコシダーゼH処理後の分子量は約 $60 \text{ kDa}$ である。
  - ②至適pH ; pH  $5.0 \sim 6.5$ である。
  - ③至適温度 ;  $45 \sim 65^\circ\text{C}$ で最大活性を示す。
  - ④基質特異性 ; フィチン酸、p-ニトロフェニルリン酸、D-グルコース 6-リン酸、フラクトース 6-リン酸、D-ミオイノシトール 1,4,5-三リン酸、グリセロールリン酸およびアデノシン三リン酸を基質として作用する。
  - ⑤等電点電気泳動 ; p.I  $4.7 \sim 5.4$ である。
3. フィターゼが、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質、または、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質のアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有しかつフィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が $10 \sim 30 \mu\text{M}$ であるフィターゼ活性を有する蛋白質である、請求項1または2記載のフィターゼ。
4. フィターゼが、アスペルギルス属に属する微生物由来のフィターゼである、請求項1または2記載のフィターゼ。
5. アスペルギルス属に属する微生物が、アスペルギルス・ニガーSK57 (FERM BP-5473) およびアスペルギルス・ニガーSK92 (FERM BP-5481) から選ばれる微生物である、請求項4記載のフィターゼ。
6. フィターゼが、糖鎖を有するフィターゼである、請求項1、2または3記載のフィターゼ。



7. フィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が  $10 \sim 30 \mu\text{M}$  であるフィターゼをコードする遺伝子。

8. フィターゼが、下記の物理化学的性質を有するフィターゼである、請求項7記載の遺伝子。

①分子量 (SDS-PAGE法) ; エンドグリコシダーゼH処理後の分子量は約  $60 \text{ kDa}$  である。

②至適pH ;  $\text{pH } 5.0 \sim 6.5$  である。

③至適温度 ;  $45 \sim 65^\circ\text{C}$  で最大活性を示す。

④基質特異性 ; フィチン酸、p-ニトロフェニルリン酸、D-グルコース 6-リン酸、フラクトース 6-リン酸、D-ミオ-イノシトール 1,4,5-三リン酸、グリセロールリン酸およびアデノシン三リン酸を基質として作用する。

⑤等電点電気泳動 ;  $\text{pI } 4.7 \sim 5.4$  である。

9. 遺伝子が、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質、または、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質のアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有しかつフィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が  $10 \sim 30 \mu\text{M}$  であるフィターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、請求項7または8記載の遺伝子。

10. 遺伝子が、配列番号4および5で表されるDNAから選ばれる遺伝子である、請求項7または8記載の遺伝子。

11. 遺伝子が、アスペルギルス属に属する微生物由来の遺伝子である、請求項7または8記載の遺伝子。

12. アスペルギルス属に属する微生物が、アスペルギルス・ニガー SK 57 (FERM BP-5473) およびアスペルギルス・ニガー SK 92 (FERM BP-5481) から選ばれる微生物である、請求項11記載の遺伝子。

13. フィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が  $10 \sim 30 \mu\text{M}$  である

フィターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

14. フィターゼが、下記の物理化学的性質を有するフィターゼである、請求項13記載の組換え体DNA。

①分子量(SDS-PAGE法)；エンドグリコシダーゼH処理後の分子量は約60kDaである。

②至適pH；pH5.0～6.5である。

③至適温度；45～65℃で最大活性を示す。

④基質特異性；フィチン酸、p-ニトロフェニルリン酸、D-グルコース 6-リン酸、フラクトース 6-リン酸、D-ミオ-イノシトール 1,4,5-三リン酸、グリセロールリン酸およびアデノシン三リン酸を基質として作用する。

⑤等電点電気泳動；pI4.7～5.4である。

15. 遺伝子が、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質、または、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質のアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有しかつフィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が10～30μMであるフィターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、請求項13または14記載の組換え体DNA。

16. 遺伝子が、配列番号4および5で表されるDNAから選ばれる遺伝子である、請求項13または14記載の組換え体DNA。

17. 遺伝子が、アスペルギルス属に属する微生物由来の遺伝子である、請求項13または14記載の組換え体DNA。

18. アスペルギルス属に属する微生物が、アスペルギルス・ニガーSK57(FERM BP-5473)およびアスペルギルス・ニガーSK92(FERM BP-5481)から選ばれる微生物である、請求項17記載の組換え体DNA。

19. 組換え体DNAが、pANPHY1である、請求項13または14記載の組換え体DNA。

20. フィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が $10 \sim 30 \mu\text{M}$ であるフィターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体。

21. フィターゼが、下記の物理化学的性質を有するフィターゼである、請求項20記載の形質転換体。

①分子量（SDS-PAGE法）；エンドグリコシダーゼH処理後の分子量は約60kDaである。

②至適pH；pH5.0～6.5である。

③至適温度；45～65℃で最大活性を示す。

④基質特異性；フィチン酸、p-ニトロフェニルリン酸、D-グルコース 6-リン酸、フラクトース 6-リン酸、D-ミオ-イノシトール 1,4,5-三リン酸、グリセロールリン酸およびアデノシン三リン酸を基質として作用する。

⑤等電点電気泳動；pI4.7～5.4である。

22. 遺伝子が、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質、または、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質のアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有しかつフィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が $10 \sim 30 \mu\text{M}$ であるフィターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、請求項20または21記載の形質転換体。

23. 遺伝子が、配列番号4および5で表されるDNAから選ばれる遺伝子である、請求項20または21記載の形質転換体。

24. 遺伝子が、アスペルギルス属に属する微生物由来の遺伝子である、請求項20または21記載の形質転換体。

25. アスペルギルス属に属する微生物が、アスペルギルス・ニガーSK57

(FERM BP-5473) およびアスペルギルス・ニガーSK92 (FERM BP-5481) から選ばれる微生物である、請求項24記載の形質転換体。

26. 組換え体DNAが、pANPHY1である、請求項20または21記載の形質転換体。

27. 形質転換体が、エッシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、アスペルギルス属、リゾプス属、トリコデルマ属、ノイロスポラ属、ムコール属、ベニシリウム属、クルイベロミセス属、サッカロマイセス属およびシゾサッカロマイセス属に属する微生物から選ばれる微生物である、請求項20または21記載の形質転換体。

28. 形質転換体が、アスペルギルス・ニガーMH-PA1 (FERM BP-5372)、アスペルギルス・ニデュランスM-PA1 (FERM BP-5373) およびアスペルギルス・オリゼMO-PG3から選ばれる微生物である、請求項20または21記載の形質転換体。

29. フィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が $10 \sim 30 \mu\text{M}$ であるフィターゼを生成蓄積する能力を有する微生物を培地中で培養し、該フィターゼを生成蓄積させ、該培養物より該フィターゼを採取することを特徴とするフィターゼの製造法。

30. フィターゼが、下記の物理化学的性質を有するフィターゼである、請求項29記載の製造法。

①分子量 (SDS-PAGE法) ; エンドグリコシダーゼH処理後の分子量は約60kDaである。

②至適pH ; pH 5.0 ~ 6.5である。

③至適温度 ;  $45 \sim 65^\circ\text{C}$ で最大活性を示す。

④基質特異性 ; フィチン酸、p-ニトロフェニルリン酸、D-グルコース 6-リン酸、フラクトース 6-リン酸、D-ミオ-イノシトール 1,4,5-三リン酸、グリセロールリン酸およびアデノシン三リン酸を基質として作用する。

⑤等電点電気泳動；p I 4. 7～5. 4である。

31. 微生物が、アスペルギルス・ニガーSK57 (FERM BP-5473) およびアスペルギルス・ニガーSK92 (FERM BP-5481) から選ばれる微生物である、請求項29または30記載の製造法。

32. 微生物が、フィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が10～30  $\mu$ Mであるフィターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体である、請求項29または30記載の製造法。

33. 遺伝子が、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質、または、配列番号1、2および3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質から選ばれる蛋白質のアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が置換、欠失または付加したアミノ酸配列を有しかつフィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が10～30  $\mu$ Mであるフィターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である、請求項32記載の製造法。

34. 遺伝子が、配列番号4および5で表されるDNAから選ばれる遺伝子である、請求項32記載の製造法。

35. 遺伝子が、アスペルギルス属に属する微生物由来の遺伝子である、請求項32記載の製造法。

36. アスペルギルス属に属する微生物が、アスペルギルス・ニガーSK57 (FERM BP-5473) およびアスペルギルス・ニガーSK92 (FERM BP-5481) から選ばれる微生物である、請求項35記載の製造法。

37. 組換え体DNAが、pANPHY1である、請求項32記載の製造法。

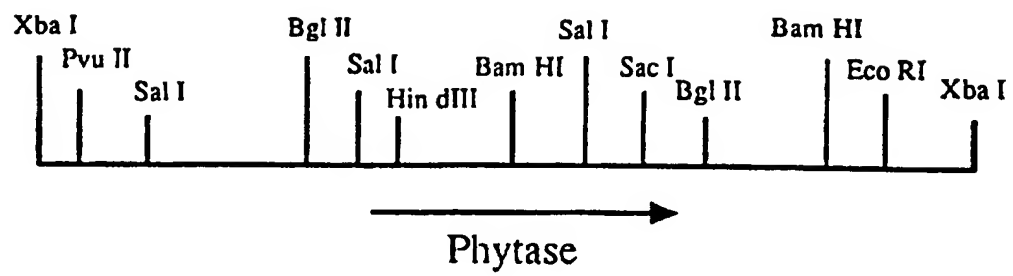
38. 形質転換体が、エッシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、アスペルギルス属、リゾプス属、トリコデルマ属、ノイロスボラ属、ムコール属、ペニシリウム属、クルイペロミセス属、サッカロマイセス属およびシゾサッカロマイセス属に属する

微生物から選ばれる微生物である、請求項 3 2 記載の製造法。

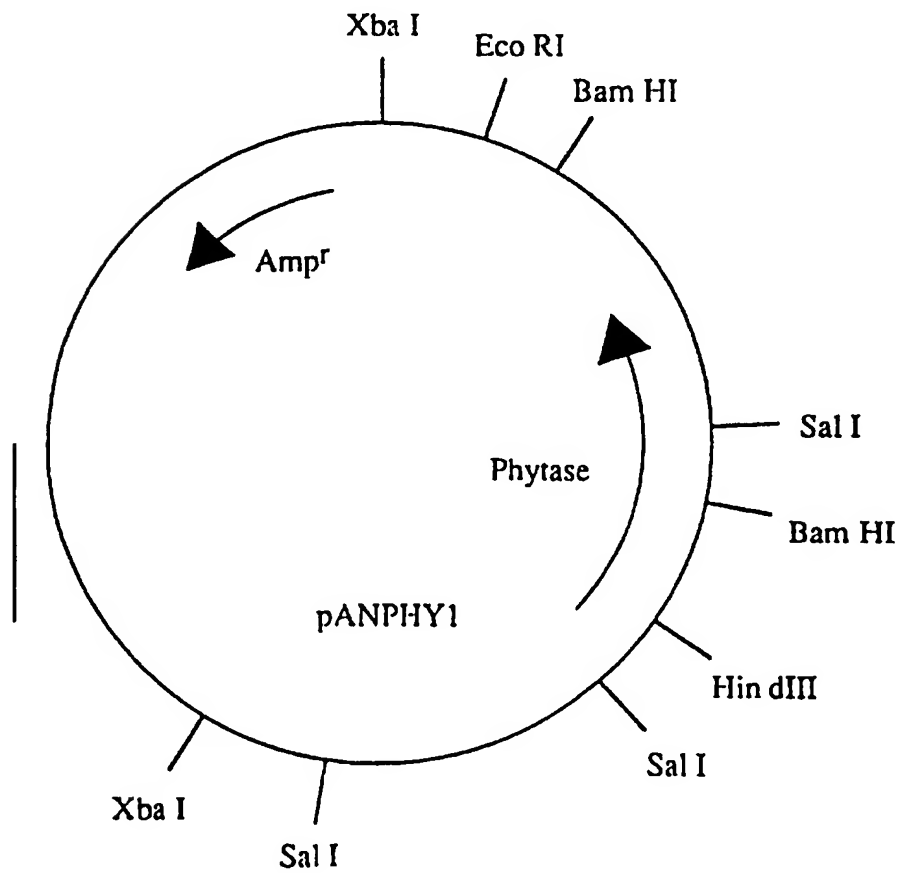
3 9. 形質転換体が、アスペルギルス・ニガーMH-PA1 (FERM BP-5372)、アスペルギルス・ニデュランスM-PA1 (FERM BP-5373) およびアスペルギルス・オリゼMO-PG3 から選ばれる微生物である、請求項 3 2 記載の製造法。

4 0. フィチン酸を基質としたときのミカエリス定数が  $10 \sim 30 \mu\text{M}$  であるフィターゼを含むことを特徴とする動物用飼料。

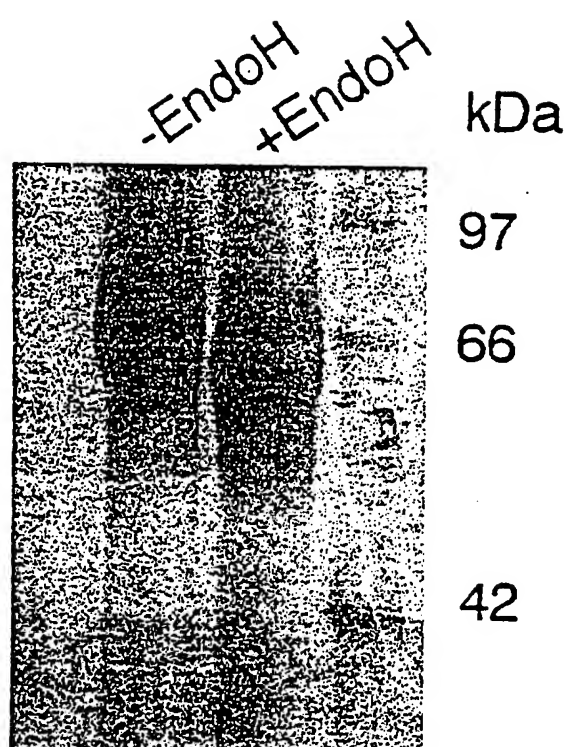
第 1 図



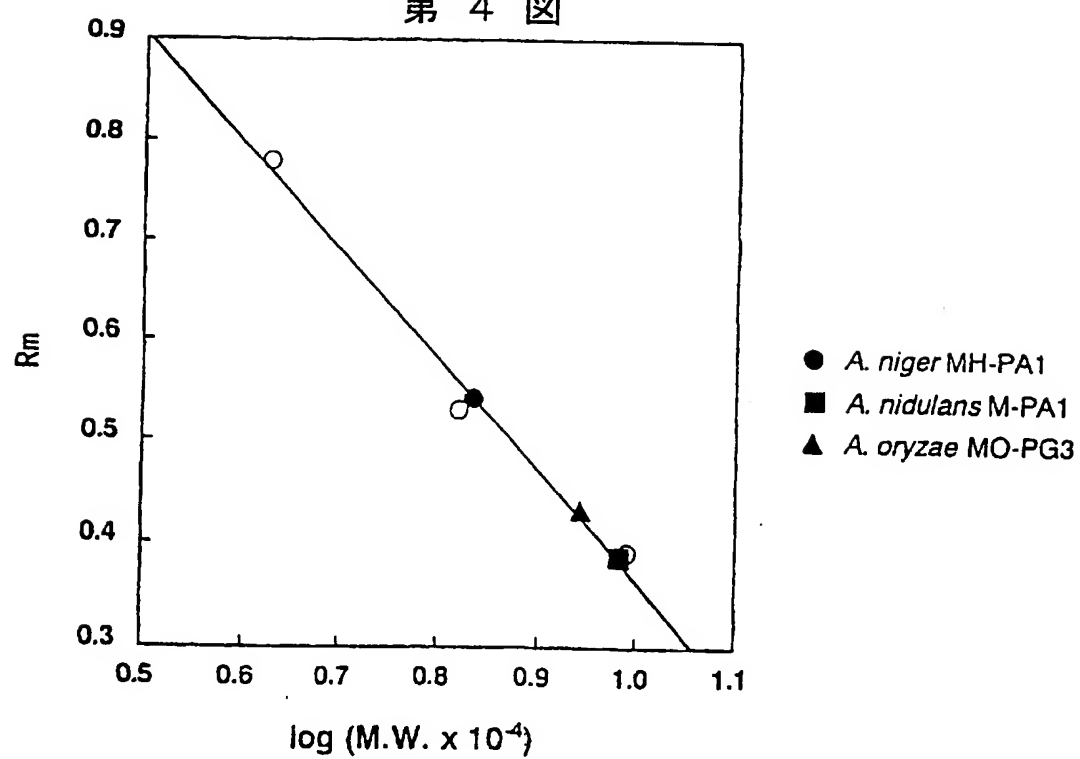
第 2 図



第 3 図

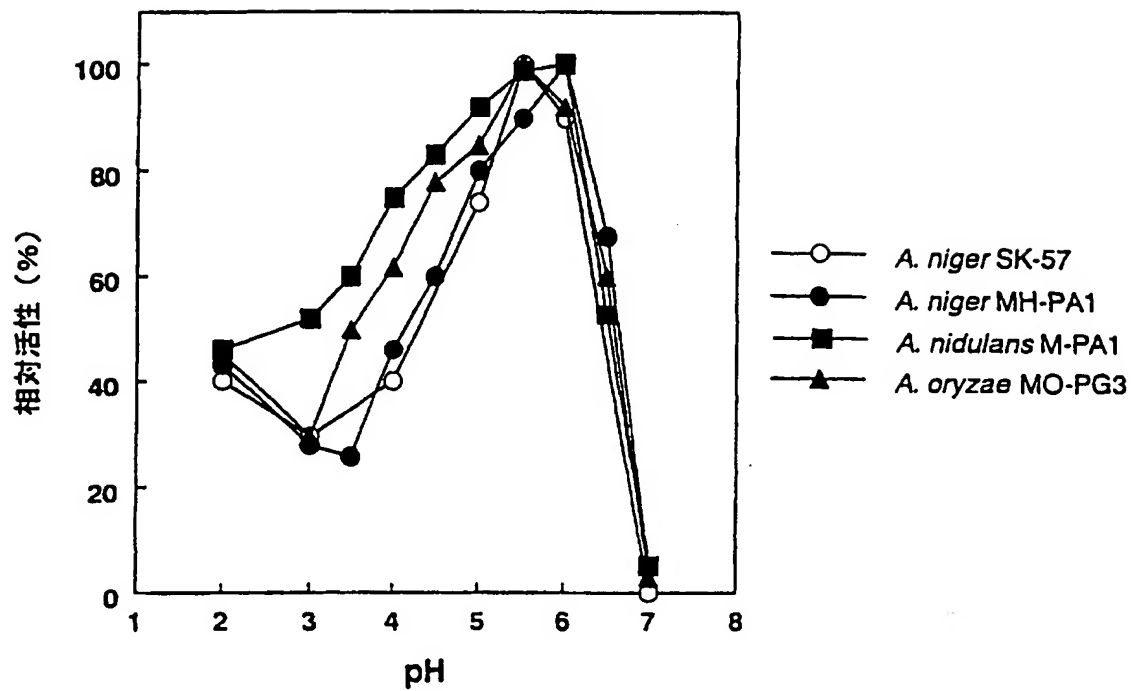


第 4 図

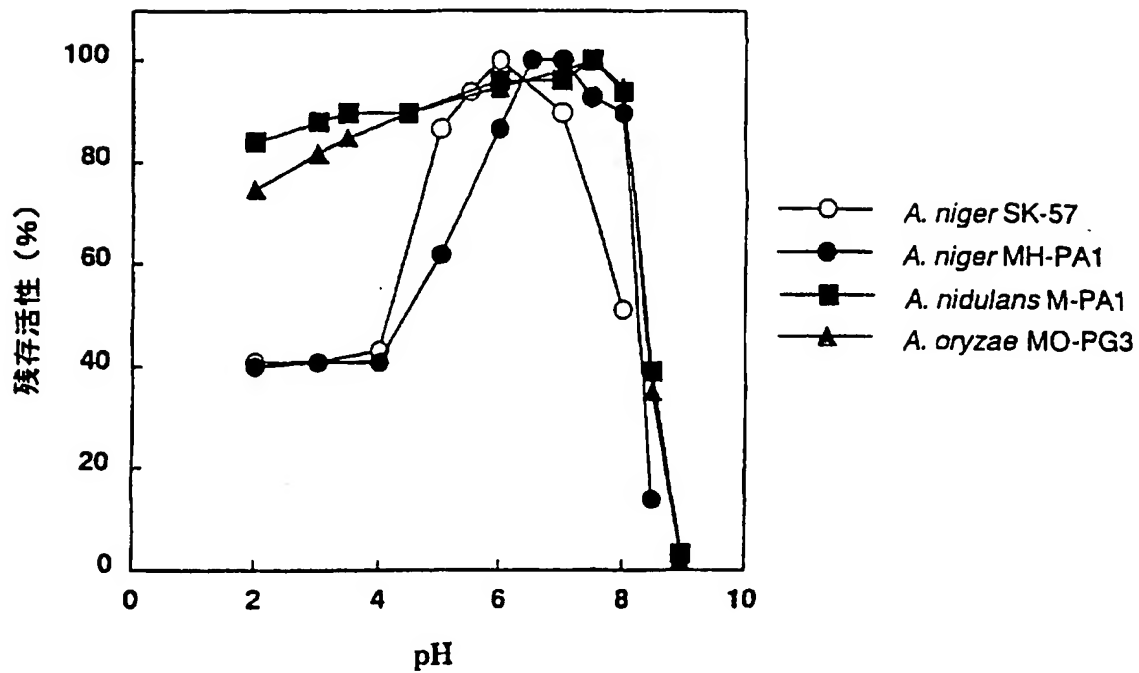




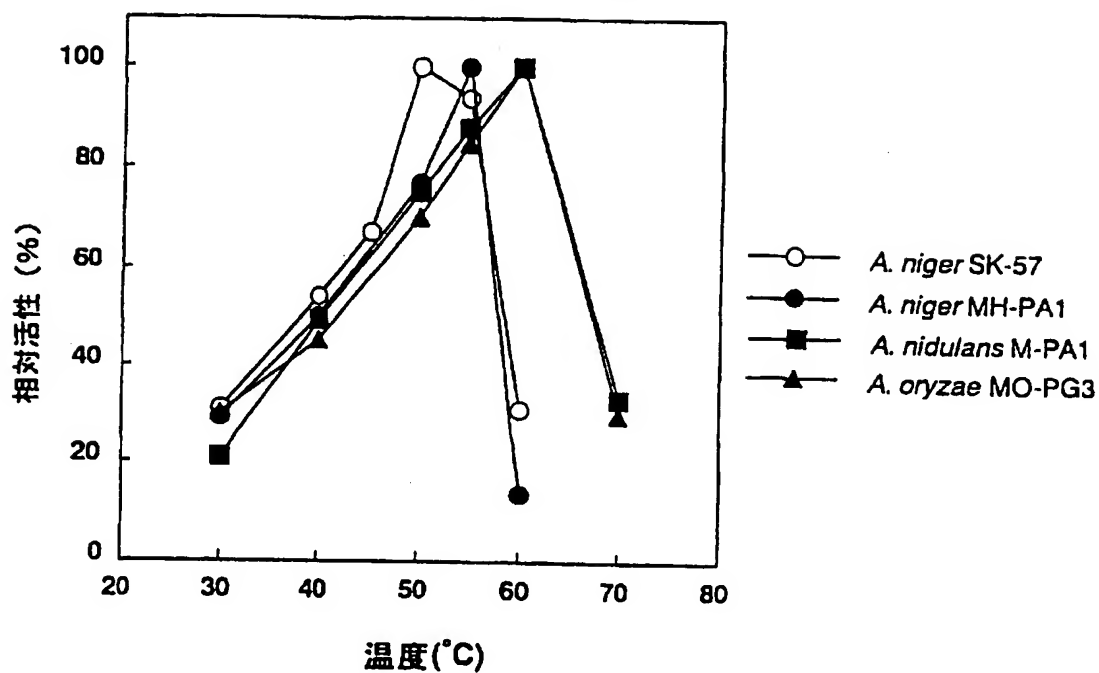
第 5 図



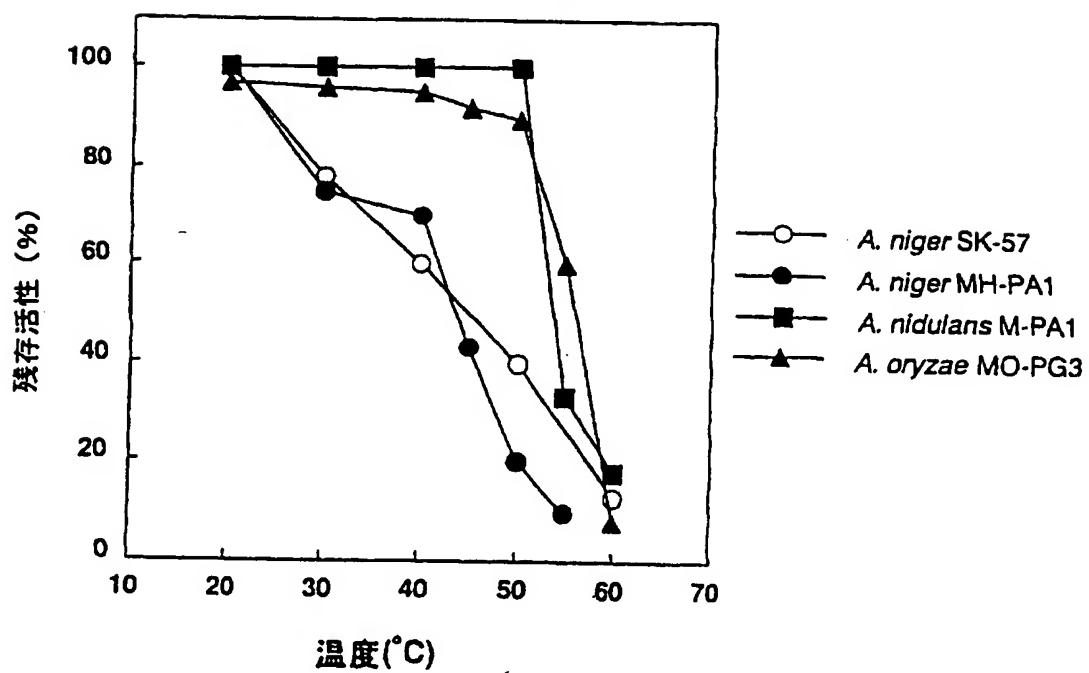
第 6 図



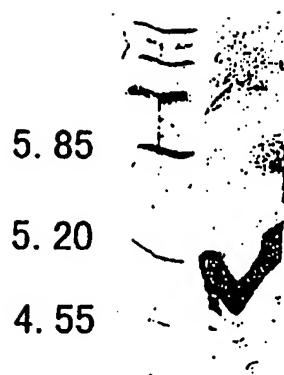
第 7 図



第 8 図



第 9 図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01175

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. C1 <sup>6</sup> C12N9/16, C12N15/55, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, A23K1/165 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C1 <sup>6</sup> C12N9/16, C12N15/55, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, A23K1/165 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI/L, CAS ONLINE, BIOSIS, GENETYX-CD		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Agric. Biol. Chem, <u>49</u> (12) (1985), p. 3539-3544	1, 40
A	JP, 6-501838, A1 (Gist-Brocades N.V. and another), March 3, 1994 (03. 03. 94) & EP, 449375, A1 & WO, 91/14782, A1 & US, 5593963, A	1 - 40
A	JP, 4-506007, A1 (Gist-Brocades N.V.), October 22, 1992 (22. 10. 92) & EP, 420358, A1 & WO, 91/05053, A1 & US, 5436156, A	1 - 40
A	JP, 7-95946, B2 (Ichibiki K.K.), October 18, 1995 (18. 10. 95) (Family: none)	1 - 40
A	Gene, <u>133</u> (1993), p. 55-62	1 - 40
A	Gene, <u>127</u> (1993), p. 87-94	1 - 40
A	Appl. Microbiol. Biotechnol, <u>35</u> (1991), p. 611-614	1 - 40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search July 1, 1997 (01. 07. 97)		Date of mailing of the international search report July 8, 1997 (08. 07. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>1</sup> C12N 9/16, C12N 15/55, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, A23K 1/165		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>1</sup> C12N 9/16, C12N 15/55, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, A23K 1/165		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI/L, CAS ONLINE, BIOSIS, GENETYX-CD		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Agric. Biol. Chem. 49 [12] (1985), p. 3539-3544	1, 40
A	JP, 6-501838, A1 (キヌト プロテウス ナムロ-セ フェノ-トシヤフ 外1名) 3. 3月. 1994 (03. 03. 94) & EP, 449375, A1 & WO, 91/14782, A1 & US, 5593963, A	1-40
A	JP, 4-506007, A1 (キヌト プロテウス ナムロ-セ フェノ-トシヤフ) 22. 10月. 1992 (22. 10. 92) & EP, 420358, A1 & WO, 91/05053, A1 & US, 5436156, A	1-40
A	JP, 7-95946, B2 (イチビキ株式会社) 18. 10月. 1995 (18. 10. 95) (ファミリーなし)	1-40
A	Gene, 133 (1993), p. 55-62	1-40
A	Gene, 127 (1993), p. 87-94	1-40
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01. 07. 97		国際調査報告の発送日 08.07.97
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹内 亜希 印 4 B 9282 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)